

eISSN: 2564-6524



ANKARA ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
DERGİSİ

JOURNAL OF FACULTY OF PHARMACY
OF
ANKARA UNIVERSITY

Cilt / Vol : 45
Sayı / No : 3
Yıl / Year : 2021

eISSN: 2564-6524



**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
DERGİSİ**

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

**Cilt / Vol: 45
Sayı / No: 3
Yıl / Year: 2021**

ANKARA ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ DERGİSİ

(Ankara Ecz. Fak. Derg.)

eISSN: 2564-6524

Sahibi:

Prof. Dr. Asuman BOZKIR

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*

Yardımcı Editörler:

Prof. Dr. Canan HASÇİÇEK

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
e-posta: cogan@pharmacy.ankara.edu.tr*

Doç. Dr. Işıl ÖZAKÇA GÜNDÜZ

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı
e-posta: ozakca@ankara.edu.tr*

Alan Editörleri:

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. Ceyda Tuba ŞENGEL TÜRK

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
e-posta: ctsengel@pharmacy.ankara.edu.tr*

Doç. Dr. Özge ÜLKER

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı
e-posta: oulker@pharmacy.ankara.edu.tr*

Doç. Dr. Banu KAŞKATEPE

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
e-posta: bkaskatepe@ankara.edu.tr*

Doç. Dr. Kayhan BOLELLİ

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı
e-posta: bolelli@ankara.edu.tr*

Doç. Dr. Zuhâl KILIÇ KURT

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı
e-posta: zkurt@ankara.edu.tr*

Dr. Öğr. Üyesi Aşlı KOÇ

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı
e-posta: akoc@ankara.edu.tr*

Dr. Burçin ERGENE

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı
e-posta: ergene@pharmacy.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*

Dr. Berna GÜVEN

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı
e-posta: bguven@ankara.edu.tr*

Dr. Derya ÇİÇEK POLAT

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı
e-posta: polatd@ankara.edu.tr*

Dr. Ecem KAYA SEZGİNER

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı
e-posta: ecemkaya@ankara.edu.tr*

Dr. Aysu SELÇUK

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Klinik Eczacılık Anabilim Dalı
e-posta: aysuselcuk@ankara.edu.tr*

Uzm. Ecz. Melek KARACAOĞLU

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı
e-posta: mkaracaoglu@ankara.edu.tr*

Editorial Danışma Kurulu:

- Prof. Dr. Afonso Miguel Neves CAVACO *Lizbon Üniversitesi, Lizbon, PORTEKİZ*
Prof. Dr. Arzu Onay BEŞİKCİ *Ankara Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*
Prof. Dr. Athina GERONIKAKI *Aristoteles Üniversitesi, Selanik, YUNANİSTAN*
Prof. Dr. Ayşegül KÖROĞLU *Ankara Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*
Prof. Dr. Bezhan CHANKVETADZE *Ivane Javakishvili Tiflis Devlet Üniversitesi, Tiflis, GÜRCİSTAN*
Prof. Dr. Bilgehan DOĞRU *Ankara Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*
Prof. Dr. Gökçe TOPAL TANYILMAZ *İstanbul Üniversitesi, İstanbul, TÜRKİYE*
Prof. Dr. Gülbin ÖZÇELİKAY *Ankara Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*
Prof. Dr. Gülçin Hayriye SALTAN İŞCAN *Ankara Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*
Prof. Dr. Gülgün AYHAN KILCIGİL *Ankara Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*
Prof. Dr. Istvan TOTH *Queensland Üniversitesi, AVUSTRALYA*
Prof. Dr. Ivan KOSALEC *Zagreb Üniversitesi, Zagreb, HIRVATİSTAN*
Prof. Dr. İlkay KÜÇÜKGÜZEL *Marmara Üniversitesi, İstanbul, TÜRKİYE*
Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ *Hacettepe Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*
Prof. Dr. Lütfiye Ömür DEMİREZER *Hacettepe Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*
Prof. Dr. Milan STEFEK *Slovak Bilim Akademisi, Bratislava, SLOVAK CUMHURİYETİ*
Prof. Dr. Mine HOŞGÖR LİMONCU *Ege Üniversitesi, İzmir, TÜRKİYE*
Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL *Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, TÜRKİYE*
Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL *Ankara Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*
Prof. Dr. Nina CHANISHVILI *George Eliava Bak., Mik. ve Vir. Enstitüsü, Tiflis, GÜRCİSTAN*
Prof. Dr. Nurten ALTANLAR *Ankara Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*
Prof. Dr. Rudolf BAUER *Graz Üniversitesi, Graz, AVUSTURYA*
Prof. Dr. Selen YEGENOĞLU *Hacettepe Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*
Prof. Dr. Sevgi AKAYDIN *Gazi Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*
Prof. Dr. Sibel Ayşıl ÖZKAN *Ankara Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*
Prof. Dr. Şükran KÜLTÜR *İstanbul Üniversitesi, İstanbul, TÜRKİYE*
Prof. Dr. Tülay ÇOBAN *Ankara Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*
Prof. Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU *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 bilimlerdeki önemli gelişmeleri içeren orijinal araştırmalar, derlemeler ve kısa bildirimler için uluslararası bir yayın 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. Asuman BOZKIR

Editor-in-Chief:

Prof. Dr. İlkay 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*

Associate Editors:

Prof. Dr. Canan HASÇİÇEK

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

Assoc. Prof. Dr. Işıl ÖZAKÇA GÜNDÜZ

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

Section Editors:

Assoc. Prof. Dr. İlker ATEŞ

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Toxicology

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

Assoc. Prof. Dr. Özgür ÜSTÜNDAĞ

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry

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

Assoc. Prof. Dr. Ceyda Tuba ŞENGEL TÜRK

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology

e-mail: ctsengel@pharmacy.ankara.edu.tr

Assoc. Prof. Dr. Özge ÜLKER

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Toxicology

e-mail: oulker@pharmacy.ankara.edu.tr

Assoc. Prof. Dr. Banu KAŞKATEPE

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology

e-mail: bkaskatepe@ankara.edu.tr

Assoc. Prof. Dr. Kayhan BOLELLİ

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry

e-mail: bolelli@ankara.edu.tr

Assoc. Prof. Dr. Zuhâl KILIÇ KURT

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry

e-mail: zkurt@ankara.edu.tr

Assist. Prof. Dr. Aslı KOÇ

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry

e-mail: akoc@ankara.edu.tr

Dr. Burçin ERGENE

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy

e-mail: ergene@pharmacy.ankara.edu.tr

Dr. M. Mesud HÜRKUL

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany

e-mail: mhurkul@ankara.edu.tr

Dr. Gizem GÜLPINAR

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacy Business Administration

e-mail: gaykac@ankara.edu.tr

Dr. Berna GÜVEN

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology

e-mail: bguven@ankara.edu.tr

Dr. Derya ÇİÇEK POLAT

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany

e-mail: polatd@ankara.edu.tr

Dr. Ecem KAYA SEZGİNER

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry

e-mail: ecemkaya@ankara.edu.tr

Dr. Aysu SELÇUK

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Clinical Pharmacy

e-mail: aysuselcuk@ankara.edu.tr

Pharm. MSc. Melek KARACAOĞLU

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy

e-mail: mkaracaoglu@ankara.edu.tr

Editorial Advisory Board:

- Prof. Dr. Afonso Miguel Neves CAVACO *University of Lisbon, Lisbon, PORTUGAL*
Prof. Dr. Arzu ONAY BEŐIKCİ *Ankara University, Ankara, TURKEY*
Prof. Dr. Athina GERONIKAKI *Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, GREECE*
Prof. Dr. Ayőegöl KÖROĞLU *Ankara University, Ankara, TURKEY*
Prof. Dr. Bezhan CHANKVETADZE *Ivane Javakhishvili Tbilisi State University, Tbilisi, GEORGIA*
Prof. Dr. Bilgehan DOĞRU *Ankara University, Ankara, TURKEY*
Prof. Dr. Gökçe TOPAL TANYILMAZ *İstanbul University, İstanbul, TURKEY*
Prof. Dr. Gülbin ÖZÇELİKAY *Ankara University, Ankara, TURKEY*
Prof. Dr. Gülçin Hayriye SALTAN İŞCAN *Ankara University, Ankara, TURKEY*
Prof. Dr. Gülgün AYHAN KILCIGİL *Ankara University, Ankara, TURKEY*
Prof. Dr. Istvan TOTTH *University of Queensland, AUSTRALIA*
Prof. Dr. Ivan KOSALEC *Zagreb University, Zagreb, CROATIA*
Prof. Dr. İlkey KÜÇÜKGÜZEL *Marmara University, İstanbul, TURKEY*
Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ *Hacettepe University, Ankara, TURKEY*
Prof. Dr. Lütfiye Ömür DEMİREZER *Hacettepe University, Ankara, TURKEY*
Prof. Dr. Milan STEFEK *Slovak Academy of Sciences, Bratislava, SLOVAK REPUBLIC*
Prof. Dr. Mine HOŞGÖR LİMONCU *Ege University, İzmir, TURKEY*
Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL *Anadolu University, Eskişehir, TURKEY*
Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL *Ankara University, Ankara, TURKEY*
Prof. Dr. Nina CHANISHVILI *George Eliava Institute of Bac., Mic. and Vir., Tbilisi, GEORGIA*
Prof. Dr. Nurten ALTANLAR *Ankara University, Ankara, TURKEY*
Prof. Dr. Rudolf BAUER *University of Graz, Graz, AUSTRIA*
Prof. Dr. Selen YEĞENOĞLU *Hacettepe University, Ankara, TURKEY*
Prof. Dr. Sevgi AKAYDIN *Gazi University, Ankara, TURKEY*
Prof. Dr. Sibel Aysıl ÖZKAN *Ankara University, Ankara, TURKEY*
Prof. Dr. şükran KÜLTÜR *İstanbul University, İstanbul, TURKEY*
Prof. Dr. Tülay ÇOBAN *Ankara University, Ankara, TURKEY*
Prof. Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU *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 45(3), 2021

Özgün Makaleler / Original Articles

Sayfa / Page

- Andrii A. SAFONOV, Alina V. NEVMYVAKA, Olexandr I. PANASENKO, Yevgeniy G. KNYSH - **MICROWAVE SYNTHESIS OF 3- AND 4-SUBSTITUTED-5-((3-PHENYLPROPYL)THIO)-4H-1,2,4-TRIAZOLES** - 3- VE 4-SÜBSTİTÜE-5-((3-FENİLPROPİL)TİYO)-4H-1,2,4-TRİAZOLLERİN MİKRODALGA SENTEZİ **457**
- Aarthi Kundam VASUDEVAN, Hemamalini RAJAGOPAL, Sambanthan MUTHU, Fazilath Basha ASIF, Badiadka NARAYANA - **STRUCTURAL AND PHARMACEUTICAL EVALUATION OF 4-HYDROXY-BENZAMIDE DERIVATIVE: ANTI-BACTERIAL AND ANTI-VIRAL POTENT** - 4-HİDROKSİ-BENZAMİD TÜREVİNİN YAPISAL VE FARMASÖTİK DEĞERLENDİRMESİ: ANTİ-BAKTERİYAL VE ANTİ-VİRAL ETKİ **467**
- Gülderen YILMAZ, Gözde ÖZTÜRK, Betül DEMİRCİ - **TÜRKİYE'DE DOĞAL OLARAK YETİŞEN *CELTIS AUSTRALIS* L. VE *C. TOURNEFORTII* LAM. (CANNABACEAE) MEYVELERİNİN YAĞ ASİTİ BİLEŞİMLERİ VE ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ** - EVALUATION OF FATTY ACID COMPOSITIONS AND ANTIMICROBIAL EFFECTS OF *CELTIS AUSTRALIS* L. AND *C. TOURNEFORTII* LAM. (CANNABACEAE) NATURALLY DISTRIBUTED IN TURKEY **480**
- Sinan BULUT, Emrah BİLGENER - **TÜRKİYE'DE YARDIMCI ECZACILIK UYGULAMASI: ECZACILARIN PERSPEKTİFİ** - ASSISTANT PHARMACIST PRACTICES IN TURKEY: PHARMACISTS' PERSPECTIVES **491**
- Roman SHCHERBYNA, Olexandr PANASENKO, Olha POLONETS, Natalia NEDOREZANIUK, Maryna DUCHENKO - **SYNTHESIS, ANTIMICROBIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF YLIDENHYDRAZIDES OF 2-((4-R-5-R1-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-YL)THIO)ACETALDEHYDES** - 2-((4-R-5-R1-4H-1,2,4-TRİAZOL-3-İL)TİYO)ASETALDEHİTLERİN İLİDENHİDRAZİDLERİNİN SENTEZİ, ANTİMİKROBİYAL VE ANTİFUNGAL AKTİVİTESİ **504**
- Hilal Basak EROL, Banu KASKATEPE - **ISOLATION OF NEWLY ISOLATED VB_K1 BACTERIOPHAGE AND INVESTIGATION OF SUSCEPTIBILITY ON ESBL POSITIVE KLEBSIELLA SPP. STRAINS** - YENİ İZOLE EDİLEN VB K1 BAKTERİYOFAJININ İZOLASYONU VE ESBL POZİTİF KLEBSİELLA TÜRLERİ ÜZERİNE DUYARLILIĞININ ARAŞTIRILMASI **515**
- Falah Saleh MOHAMMED, Nuh KORKMAZ, Mehmet DOĞAN, Ali Erdem ŞABİK, Mustafa SEVİNDİK - **SOME MEDICINAL PROPERTIES OF *GLYCYRRHIZA GLABRA* (LICORICE)** - *GLYCYRRHIZA GLABRA*'NIN BAZI TIBBİ ÖZELLİKLERİ (MEYAN KÖKÜ) **524**
- Özgür ÜSTÜNDAĞ, Erdal DİNÇ - **SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF ACTIVE COMPOUNDS IN AN ANTIHYPERTENSIVE FORMULATION BY HAAR-CWT METHOD** - BİR ANTİHİPERTANSİF FORMÜLASYONDAKİ AKTİF BİLEŞİKLERİN HAAR-CWT YÖNTEMİYLE SPEKTROFOTOMETRİK TAYİNİ **535**
- Özgür ÜSTÜNDAĞ, Erdal DİNÇ - **VALIDATION STUDY OF A SPECTROPHOTOMETRIC BINARY MIXTURE ANALYSIS** - BİR SPEKTROFOTOMETRİK İKİLİ KARIŞIM ANALİZİNİN DOĞRULAMA ÇALIŞMASI **545**
- Nuh KORKMAZ, Alpaslan DAYANGAÇ, Mustafa SEVİNDİK - **ANTIOXIDANT, ANTIMICROBIAL AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITIES OF *GALIUM APARINE*** - *GALIUM APARINE*'NİN ANTİOKSİDAN, ANTİMİKROBİYAL VE ANTİPROLİFERATİF





AKTİVİTELERİ	554
Begüm EVRANOS AKSÖZ - MOLECULAR DOCKING STUDIES ON SOME 4,5-DIHYDRO-1H-PYRAZOLE DERIVATIVES AS CYCLOOXYGENASE INHIBITORS - SİKLOOKSİJENAZ İNHİBİTÖRLERİ OLARAK BAZI 4,5-DİHİDRO-1H-PİRAZOL TÜREVLERİ ÜZERİNDE MOLEKÜLER DOKİNG ÇALIŞMALARI	565
Safa GÜMÜŞOK, Sezen YILMAZ SARIALTIN, Tülay ÇOBAN, Ceyda Sibel KILIÇ - A PRELIMINARY STUDY ON THE ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF OPOANAX HISPIDUS - OPOANAX HISPIDUS'UN ANTIÖKSİDAN VE ANTI-INFLAMMATUAR AKTİVİTELERİ ÜZERİNE BİR ÖN ÇALIŞMA	577
Derlemeler / Reviews	
Muhammed Mesud HÜRKUL - ANTEP FISTIĞI (PISTACIA VERA L.) MEYVE KABUĞU: BİYOAKTİF BİLEŞİKLER İÇİN POTANSİYEL KAYNAK - PISTACHIO (PISTACIA VERA L.) FRUIT HULL: POTENTIAL SOURCE FOR BIOACTIVE COMPOUNDS	586
Yurii G. SAMELIUK, Fadi AL ZEDAN, Tetyana M. KAPLAUSHENKO - 1,2,4-TRIAZOLE DERIVATIVES IN MEDICINE AND PHARMACY AND APPLICATION PROSPECTS - TIP VE ECZACILIK ALANINDAKİ 1,2,4-TRİAZOL TÜREVLERİ VE UYGULAMA ÖNERİLERİ	598
Hemlata DANGI, Ratnesh DAS, Sushil KASHAW - SYNTHESIS OF INDOLES DERIVATIVES USING METAL FREE CATALYST IN ORGANIC REACTIONS - ORGANİK REAKSİYONLARDA METAL İÇERMİYEN KATALİZÖR KULLANILARAK İNDOL TÜREVLERİNİN SENTEZİ	615
Özge BALPINAR, Selim AYTAÇ - TIBBİ KENEVİR VE SAĞLIK: FARMAKOLOJİK BİR DERLEME - MEDICAL CANNABIS AND HEALTH: A PHARMACOLOGICAL REVIEW	631
Seren GÜNDOĞDU, Ümmügülsüm UÇAR, Ayşe KURUÜZÜM UZ - RESVERATROLÜN BULUNDUĞU KAYNAKLAR VE TIBBİ ÖNEMİ - SOURCES OF RESVERATROL AND ITS MEDICINAL SIGNIFICANCE	652
Hilal Ahsen TUNÇAY, Gülen İrem KAYA - ALOE VERA (L.) BURM. F. (SARISABIR) BİTKİSİNİN FİTOTERAPİDE KULLANIMI - USAGE OF ALOE VERA (L.) BURM. F. (SARISABIR) PLANT IN PHYTOTHERAPY	674
Ömer YEDİKAYA, F. Ulya BADILLI - İN VİTRO DERİ MODELLERİ - IN VITRO SKIN MODELS	699
Ayşegül KOÇYİĞİT, Benay CAN EKE - KARBONMONOKSİT ZEHİRLENMELERİNDE POSTMORTEM DEĞİŞİKLİKLER - POSTMORTEM CHANGES IN CARBON MONOXIDE POISONING	722



MICROWAVE SYNTHESIS OF 3- AND 4-SUBSTITUTED-5-((3-PHENYLPROPYL)THIO)-4H-1,2,4-TRIAZOLES

3- VE 4-SÜBSTİTÜE-5-((3-FENİLPROPİL)TİYO)-4H-1,2,4-TRİAZOLLERİN

MİKRODALGA SENTEZİ

Andrii A. SAFONOV^{1,*} , Alina V. NEVMYVAKA¹ , Olexandr I. PANASENKO¹ ,
Yevgeniy G. KNYSH² 

¹Zaporizhzhya State Medical University, Department of Natural Sciences for Foreign Students and Toxicological Chemistry, 69035, Zaporizhzhya, Ukraine.

²Zaporizhzhya State Medical University, Department of Management and Economics of Pharmacy, 69035, Zaporizhzhya, Ukraine.

ABSTRACT

Objective: The purpose of this work was to synthesize 3- and 4-substituted-5-((3-phenylpropyl)thio) 4H-1,2,4-triazoles by the Milestone Flexi Wave microwave synthesis system and choose the best method of synthesis.

Material and Method: The initial compounds 4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol (1) and 5-(2-bromophenyl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole-3-thiol (3) were synthesized at the Department of Natural Sciences for Foreign Students and Toxicological Chemistry of the Zaporizhzhya State Medical University (Ukraine). Milestone Flexi Wave microwave synthesis system was used to synthesize 3- and 4-substituted-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazoles. The elemental analysis of synthesized compounds was established by the universal analyzer Elementar Vario L cube (CHNS). The ¹H spectra (at 400 MHz) were recorded in DMSO-d₆ on a Varian MR-400 spectrometer and analyzed with ADVASP™ Analyzer program. The gas chromatograph Agilent 7890B with a 5977B mass spectrometry detector (US) was used to define the completeness of the reactions and the individuality of the resulting compounds.

Result and Discussion: The reaction was carried out in *i*-propanol medium and an equivalent amount of sodium hydroxide. (3-Bromopropyl)benzene was added to starting substances 1 and 3. To study the completeness of the reaction, different reaction times were used. Conditions such as temperature, microwave radiation, pressure were unchanged. The temperature of the reaction mixture was kept at 165°C, pressure 12.2 bar, MW ≈ 540 W. The reaction time was set at 15 minutes, 30 minutes, and 45 minutes. The most effective reaction time for obtaining 3-(thiophen-2-ylmethyl)-4-amino-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazole (2) is

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Andrii Safonov
e-mail / e-posta: 8safonov@gmail.com, **Phone / Tel.:** +38 066-177-71-06

45 minutes. The most energy efficient reaction time for 3-(2-bromophenyl)-4-phenyl-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazole (4) is 30 minutes heating. The signals of ^1H NMR for compounds 2 and 4 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: Gas chromatography, heterocyclic compounds, ^1H NMR, synthesis, 1,2,4-triazole products

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, Milestone Flexi Wave mikrodalga sentez sistemi ile 3- ve 4-süstitüe-5-((3-fenilpropil)tiyo)-4H-1,2,4-triazollerini sentezlemek ve sentez için en iyi yöntemi belirlemektir.

Gereç ve Yöntem: Başlangıç bileşikler olan 4-amino-5-(tiyofen-2-il-metil)-4H-1,2,4-triazol-3-tiyol (1) ve 5-(2-bromofenil)-4-fenil-4H-1,2,4-triazol-3-tiyol (3), Zaporizhzhya Devlet Tıp Üniversitesi (Ukrayna) Yabancı Öğrenciler için Doğa Bilimleri ve Toksikolojik Kimya Bölümü'nde sentezlendi. 3- ve 4-Süstitüe-5-((3-fenilpropil)tiyo)-4H-1,2,4-triazollerini sentezlemek için Milestone Flexi Wave mikrodalga sentez sistemi kullanıldı. Sentezlenen bileşiklerin elementel analizi, Elementar Vario L cube (CHNS) evrensel analiz cihazı ile gerçekleştirildi. ^1H -NMR spektrumları (400 MHz), DMSO- d_6 içerisinde Varian MR-400 spektrometresi ile çekildi ve ADVASP™ Analiz programı ile analiz edildi. Reaksiyonların tamamlanıp tamamlanmadığı ve elde edilen bileşiklerin tayini, 5977B kütle spektrometre detektörü içeren Agilent 7890B gaz kromatografisi ile gerçekleştirildi.

Sonuç ve Tartışma: Reaksiyon, *i*-propanol içerisinde ve eşdeğer miktarda sodyum hidroksit varlığında gerçekleştirildi. Başlangıç maddeleri 1 ve 3'e (3-bromopropil)benzen eklendi. Reaksiyonun tam olarak sonlanmasının takibi için farklı reaksiyon süreleri kullanıldı. Sıcaklık, mikrodalga radyasyonu, basınç gibi koşullar değiştirilmedi. Reaksiyon ortamının sıcaklığı 1650C'de, basınç 12.2 bar'da, MW \approx 540 W'da tutuldu. Reaksiyon süresi 15 dakika, 30 dakika ve 45 dakikaya ayarlandı. 3-(Tiyofen-2-il-metil)-4-amino-5-((3-fenilpropil)tiyo)-4H-1,2,4-triazol (2) elde etmek için en uygun reaksiyon süresi 45 dakikadır. 3-(2-Bromofenil)-4-fenil-5-((3-fenilpropil)tiyo)-4H-1,2,4-triazol (4) için en uygun reaksiyon süresi 30 dakika ısıtma olarak bulundu. Bileşik 2 ve 4 için ^1H NMR sinyalleri, önerilen yapı ile uyumludur. Sentezlenen bileşiklerin kimyasal yapılarını doğrulamak için elementel analiz (CHNS) yapıldı ve hesaplanan yüzdeler kabul edilebilir aralıkta bulundu.

Anahtar Kelimeler: Gaz kromatografisi, heterosiklik bileşikler, ^1H NMR, sentez, 1,2,4-triazol

INTRODUCTION

The search for a new substance that would have a biological and pharmacological effect [1-4] can be equated to finding a needle in a haystack. If there is no appropriate strategy and plan, this conception is desperate.

Most scientists are trying to find just that substance based on heterocyclic compounds. A rather interesting heterocyclic compound, on the basis of which a huge number of new biologically active substances has already been synthesized, is the nucleus of 1,2,4-triazole [5-8]. The new compounds 1,2,4-triazole derivatives have a variety of designs and structures.

Quite interesting methods for obtaining 1,2,4-triazole derivatives using various reagents and reaction conditions are described [9, 10]. Many hours of reactions are mainly used to obtain these substances.

A somewhat new aspect in the synthesis of 1,2,4-triazole derivatives is the use of the microwave synthesis system [11-13]. The authors claim that these systems can speed up the reaction several times and increase the quantitative yields.

To confirm this theory, we also chose the microwave synthesis system, that's why the aim of the work was to synthesize 3- and 4-substituted-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazoles by the Milestone Flexi Wave microwave synthesis system and choose the best method of synthesis.

MATERIAL AND METHOD

Chemicals

The initial compounds 4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol (1) and 5-(2-bromophenyl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole-3-thiol (3) were synthesized at the Department of natural sciences for foreign students and toxicological chemistry of the Zaporizhzhya State Medical University (Ukraine) and purified by recrystallization with content of the main component $\geq 95\%$ [14]. The sodium hydroxide (98%), 1-propanol (anhydrous, 99,7%) and (3-bromopropyl)benzene (98%) were obtained from SIGMA-ALDRICH (Germany).

Equipment

It was used as equipment the following devices. Milestone Flexi Wave microwave synthesis system (technical specifications: rotor SK-15, maximum volume - 100 ml, minimum volume - 10 ml, maximum working pressure - 100 bar, maximum temperature - 300°C, maximum shutter speed 220°C - 30 min). To determine the melting point was used the open capillary method on the OptiMelt MPA100 device with platinum RTD sensor and temperature measurements to 400°C with 0.1°C resolution. The elemental analysis of synthesized compounds was established by the universal analyzer Elementar Vario L cube (CHNS) (standard - sulfanilamide). The Varian MR-400 spectrometer and ADVASPTM Analyzer program (Umatek International Inc.) were used for recording the ¹H spectra (at 400 MHz and 100 MHz) (DMSO-d₆, $\delta = 2.49$ ppm as internal standard). The gas chromatograph Agilent 7890B with a 5977B mass spectrometry detector (US) was used to define the completeness of the reactions and the individuality of the 3-(thiophen-2-ylmethyl)-4-amino-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazole (2) and 3-(2-bromophenyl)-4-phenyl-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazole (4). The column is DB-5ms 30 m x 250 μm x 0.25 μm with length. The gas-carrier speed (helium) is 2.0 ml/min. Injection volume - 0.5 μl . Separation of the flow is 1:25. The temperature of the sampling unit is 300°C \rightarrow 10°C / s \rightarrow 310°C. Thermostat temperature: programmable, initial temperature 90°C (1 minute delay) \rightarrow 40°C/min \rightarrow 240°C \rightarrow 10°C/min \rightarrow 280°C \rightarrow 2°C/min \rightarrow 300°C (delay 31,25 min.). The total time of examination is 50 min. Temperature of interface GS/MS - 280°C; ion sources - 230°C; quadrupole mass analyzer - 150°C. Type of ionization: EI with electron energy of 70 eV. The range of mass numbers that was scanned: 50-500 m/z.

Characterization of 3-(thiophen-2-ylmethyl)-4-amino-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazole (2)

Bright brown powder; yield 76.8%; m.p. 174-1760C; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ=ppm): 7.50 (2H, m, Ar-H); 7.37 (1H, d, thiophen-H); 7.26(3H, m, Ar-H); 6.81 (1H, t, thiophen-H); 6.64 (1H, d, thiophen-H); 5,86 (2H, s, NH₂); 3.88 (2H, s, CH₂); 3.11 (2H, t, CH₂); 2.66 (2H, t, CH₂); 2.04 (2H, m, CH₂); CHNS elemental analysis Calcd. for (C₁₆H₁₈N₄S₂) : found C% 57.98, H% 5.47, N% 16.99, S% 19.48; calculated C% 58.15, H% 5.49, N% 16.95, S% 19.48 MH 330.

Characterization of 3-(2-bromophenyl)-4-phenyl-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazole (4)

Yellow powder; yield 81.6%; m.p. 149-1510C; ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ=ppm): 7.67 (2H, m, Ar-H); 7.53 (6H, m, Ar-H); 7.39 (2H, m, Ar-H); 7.26 (4H, m, Ar-H); 3.15 (2H, t, CH₂); 2.64 (2H, t, CH₂); 2.01 (2H, m, CH₂); CHNS elemental analysis Calcd. for (C₂₃H₂₀BrN₃S) : found C% 61.53, H% 4.49, N% 9.38, S% 7.15; calculated C% 61.33, H% 4.48, N% 9.33, S% 7.12. MH 450.

RESULT AND DISCUSSION

As starting materials were used 4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol (1) and 5-(2-bromophenyl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole-3-thiol (3) which were synthesized and described by us earlier [14]. 3- and 4-substituted-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazoles were obtained by adding (3-bromopropyl)benzene to starting substances 1 and 3. The synthesis was performed in *i*-propanol medium and an equivalent amount of sodium hydroxide.

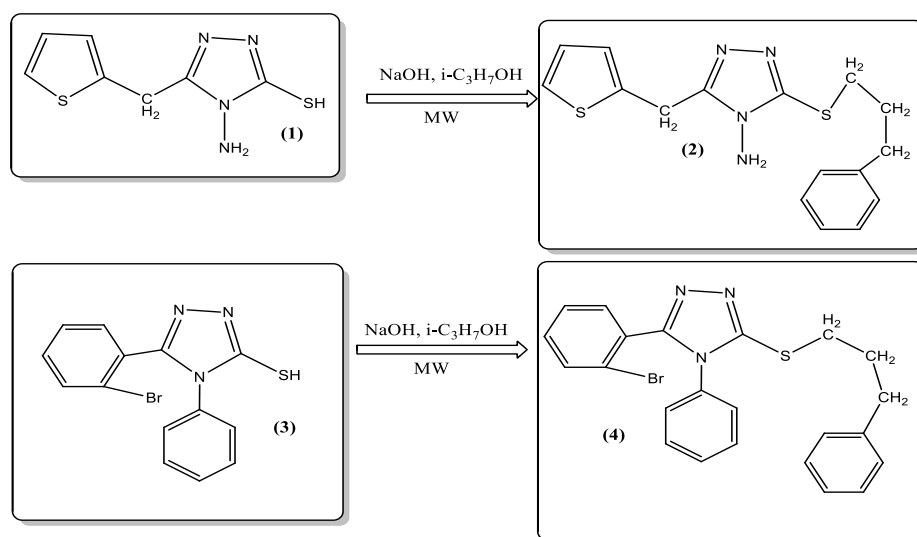


Figure 1. Synthesis of 3-(thiophen-2-ylmethyl)-4-amino-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazole (2) and 3-(2-bromophenyl)-4-phenyl-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazole (4)

Different reaction times were used to study the completeness of the reaction. Conditions (temperature, microwave radiation, pressure) were unchanged. The temperature of the reaction mixture was kept at 165°C, pressure 12.2 bar, MW \approx 540 W (Fig. 2).

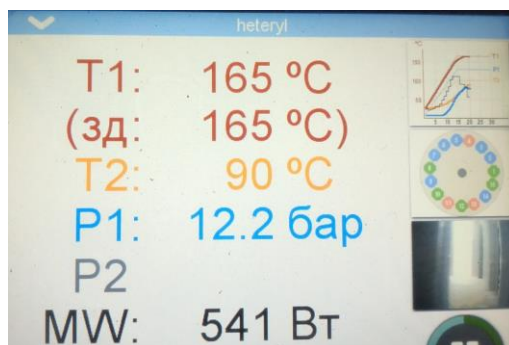


Figure 2. Conditions of microwave synthesis of 3- and 4-substituted-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazoles

For synthesis 3-(thiophen-2-ylmethyl)-4-amino-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazole (2) (Fig. 3) and 3-(2-bromophenyl)-4-phenyl-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazole (4) (Fig. 9) the reaction time was set at 15 minutes, 30 minutes, and 45 minutes. The completeness of the reaction was determined using a gas chromatograph Agilent 7890B with a mass spectrometric detector 5977B.

The most effective method for obtaining 3-(thiophen-2-ylmethyl)-4-amino-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazole: the temperature of the reaction mixture is 165°C, pressure is 12.2 bar, MW \approx 540 W, reaction time is 45 minutes.

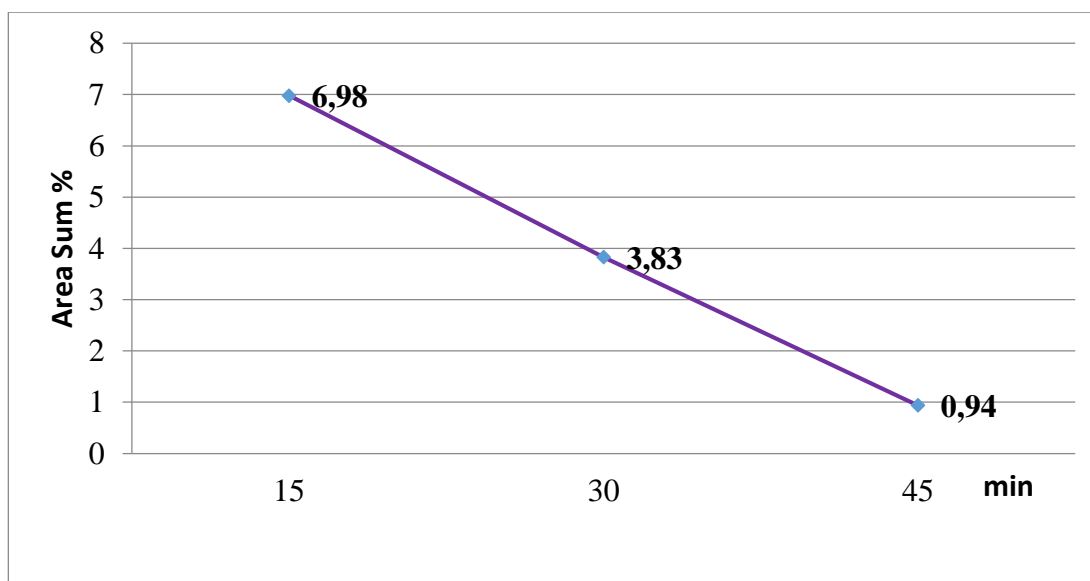


Figure 3. Concentration change of (3-bromopropyl)benzene

As can be seen from Fig. 4 the concentration of (3-bromopropyl)benzene decreases over time and the most effective is 45 minutes heating.

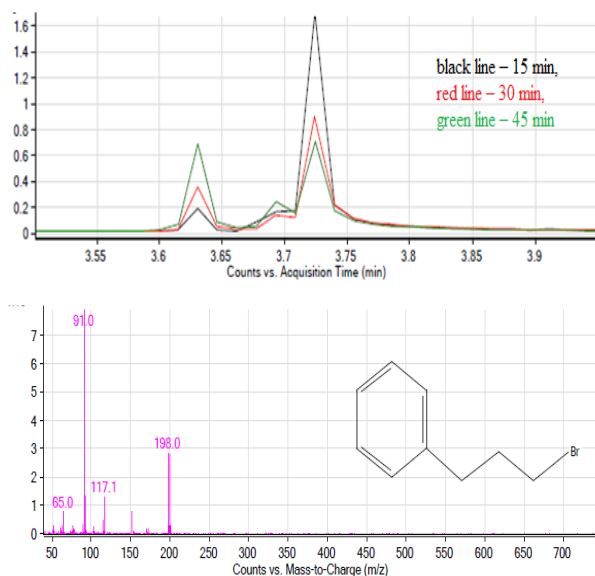


Figure 4. Common chromatogram of the reaction mixture and mass spectrum of (3-bromopropyl)benzene

Over time, the concentration of 3-(thiophen-2-ylmethyl)-4-amino-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazole also increases accordingly and after 45 minutes of heating the maximum concentration occurs (Fig. 5).

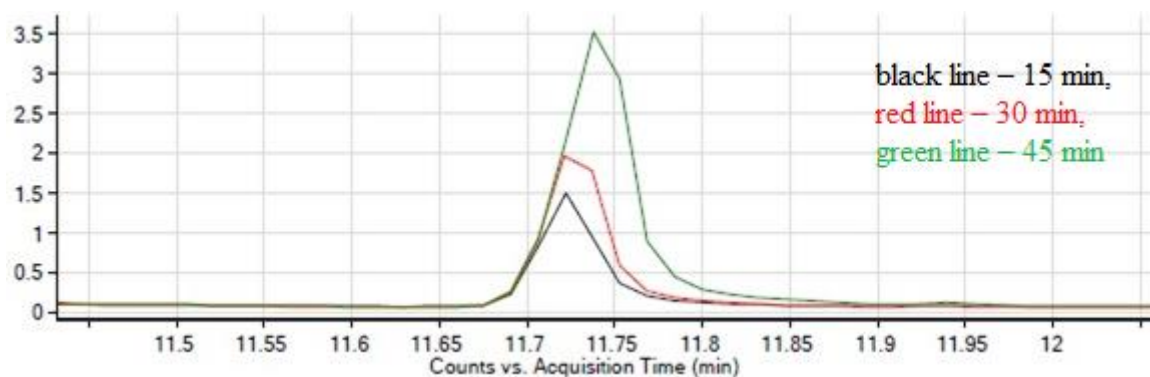


Figure 5. Common chromatogram of the reaction mixture of 3-(thiophen-2-ylmethyl)-4-amino-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazole

A molecular peak with a value of 330,1 (m/z) corresponds to 3-(thiophen-2-ylmethyl)-4-amino-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazole and match the calculated theoretical value (Fig. 6).

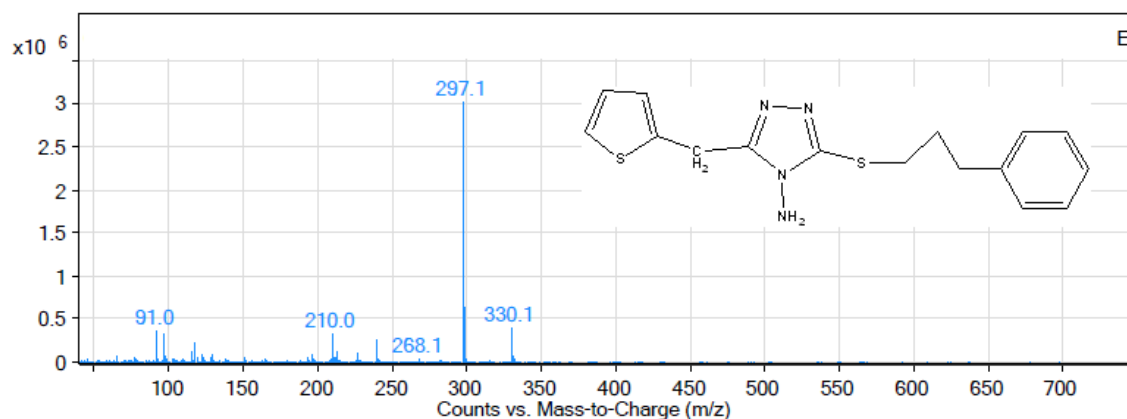


Figure 6. Mass spectrum of 3-(thiophen-2-ylmethyl)-4-amino-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazole

A slightly different situation is observed for microwave synthesis of 3-(2-bromophenyl)-4-phenyl-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazole (Fig. 7).

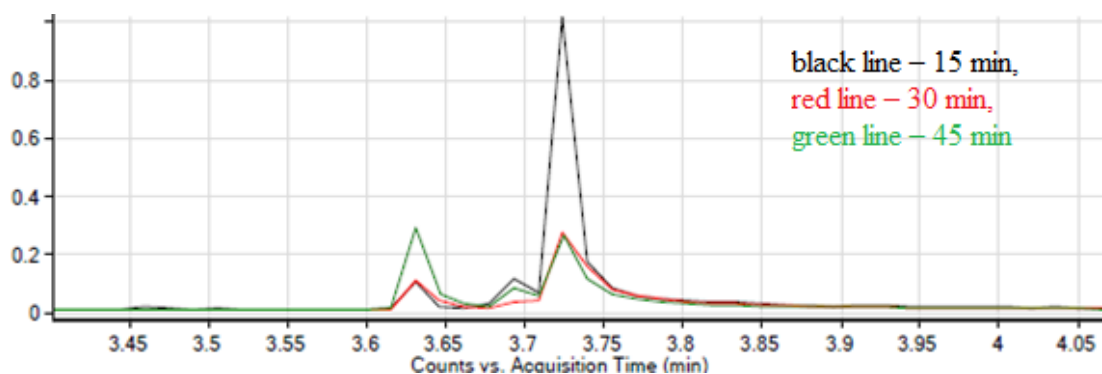


Figure 7. Common chromatogram of the reaction mixture of (3-bromopropyl)benzene

After 45 minutes heating, there is almost no change in concentration of (3-bromopropyl)benzene. The most energy efficient method is 30 minutes heating. Studying the chromatogram of compound 4 we can say the same (Fig. 8).

Analyzing the GS/MS chromatogram in the MS spectrum there is a molecular peak with a value of 451.1 (m/z), which corresponds to the calculated theoretical value of 3-(2-bromophenyl)-4-phenyl-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazole (Fig. 9).

In conclusion, 3-(thiophen-2-ylmethyl)-4-amino-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazole (2) and 3-(2-bromophenyl)-4-phenyl-5-((3-phenylpropyl)thio)-4H-1,2,4-triazole (4) (Fig. 2) were synthesized and characterized. The structure of synthesized compounds is confirmed using Elemental analysis (CHNS), ¹HNMR and Chromatographic mass spectral analysis. When the temperature of the reaction mixture was kept at 1650C, pressure 12.2 bar and MW ≈ 540 W, the most effective reaction

time is 45 minutes for compound 2 and the most energy efficient method for compound 4 is 30 minutes heating.

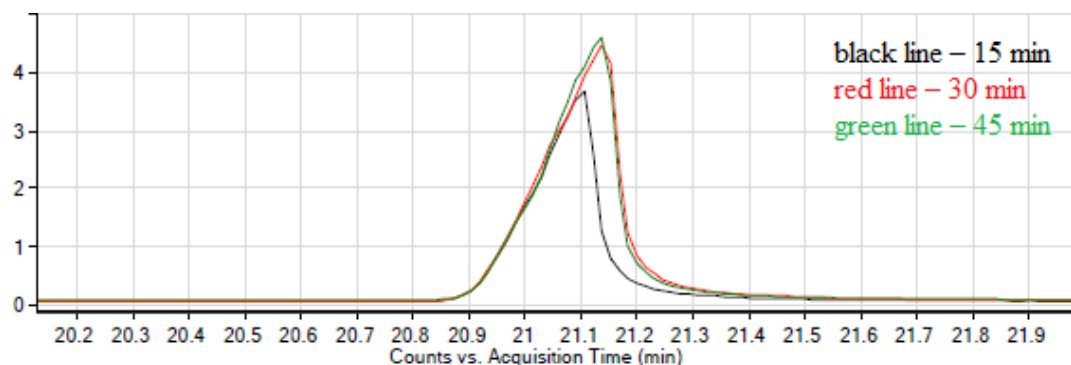


Figure 8. Common chromatogram of the reaction mixture of 3-(2-bromophenyl)-4-phenyl-5-((3-phenylpropyl)thio)-4*H*-1,2,4-triazole

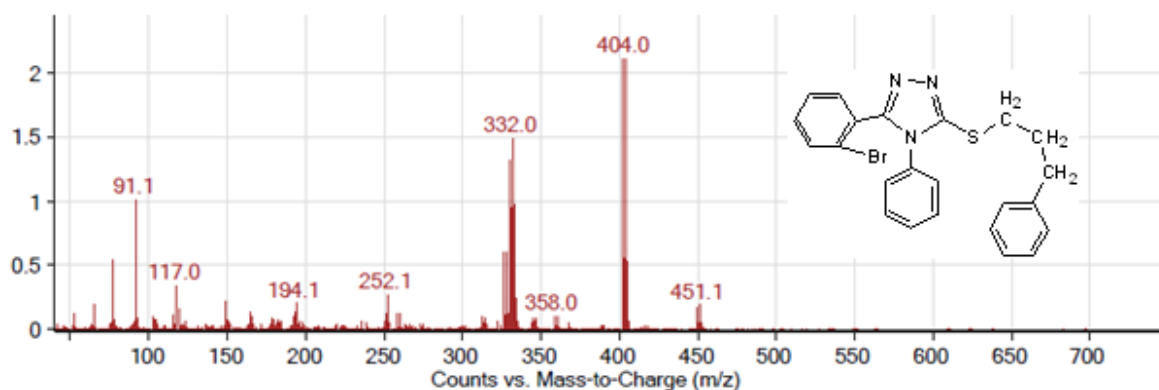


Figure 9. Mass spectrum of 3-(2-bromophenyl)-4-phenyl-5-((3-phenylpropyl)thio)-4*H*-1,2,4-triazole

ACKNOWLEDGEMENT

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

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception: A.A.S., A.V.N., O.S.P.; Design: Y.G.K., A.A.S., A.V.N.; Supervision: O.I.P., Y.G.K.; Resources: A.A.S., A.V.N.; Materials: O.I.P., Y.G.K.; Data collection and/or processing: A.A.S., O.I.P., A.V.N., Y.G.K.; Analysis and/or interpretation: A.A.S.; Literature search: A.V.N.; Writing manuscript: A.A.S., A.V.N., O.I.P., Y.G.K.; Critical review: A.A.S., A.V.N., O.I.P., Y.G.K.; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES






1. Frolova, Y., Kaplaushenko, A., Nagornaya, N. (2020). Design, synthesis, antimicrobial and antifungal activities of new 1,2,4-triazole derivatives containing 1H-tetrazole moiety. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 44(1), 70-88. [CrossRef]
2. Shcherbyna, R. (2020). An investigation of the pharmacokinetics and potential metabolites of potassium 2-((4-amino-5-(morpholinomethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate on rats. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 44(2), 233-241. [CrossRef]
3. Shcherbyna, R., Vashchyk, Y. (2019). The research of 1,2,4-triazole derivatives hepatoprotective activity under tetracycline and infectious hepatitis. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 43(2), 135-146. [CrossRef]
4. Vashchyk, Y., Shcherbyna, R., Parchenko, V., Bushueva, I., Gutyj, B., Fotina, H., Stronskyi, Y. (2020). Histological study of a corrective influence of a compound potassium 2-((4-amino-5-(morpholinomethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate (pkr-173) on the state of chicken's liver under infection by pseudomonas aeruginosa. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 44(1), 1-17. [CrossRef]
5. 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. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 42(1), 43-52. [CrossRef]
6. 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. *Current Issues in Pharmacy and Medicine: Science and Practice*, 2, 215-219. [CrossRef]
7. 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 and their chemical transformations. *Russian Journal of Biopharmaceuticals*, 10(1), 26-30, from <https://submit.biopharmj.ru/ojs238/index.php/biopharmj/article/view/439>.
8. 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, from <https://sciendo.com/downloadpdf/journals/cipms/32/1/article-p5.pdf>
9. Shcherbyna, R., Parchenko, V., Safonov, A., Bushueva, I., Zazharskiy, V., Zazharskiy, V., Borovik, I. (2018). Synthesis and research of the impact of new derivatives of 4-R-3

- (morpholinomethyl)-4H-1,2,4-triazole-5-thiol on cultural attributes of pathogenic *M. Bovis*. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, 9(2), 70-79, from [https://www.rjpbcs.com/pdf/2018_9\(2\)/\[11\].pdf](https://www.rjpbcs.com/pdf/2018_9(2)/[11].pdf)
10. 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. *Current Issues in Pharmacy and Medicine: Science and Practice*, 3(16), 18-21, from <http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/30016/26747>
 11. Mermer, A., Demirbaş, N., Şirin, Y., Uslu, H., Özdemir, Z., Demirbaş, A. (2018). Conventional and microwave prompted synthesis, antioxidant, anticholinesterase activity screening and molecular docking studies of new quinolone-triazole hybrids. *Bioorganic chemistry*, 78, 236-248. [\[CrossRef\]](#)
 12. Shcherbyna, R. (2019). Microwave-assisted synthesis of some new derivatives of 4-substituted-3-(morpholinomethyl)-4H-1, 2, 4-triazole-5-thioles. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 43(3), 220-229. [\[CrossRef\]](#)
 13. Safonov, A. (2020). Microwave synthesis of new N-R-3-(alkylthio)-5-(thiophen-2-ylmethyl)-1,2,4-triazol-4-amines. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 44(1), 89-98. [\[CrossRef\]](#)
 14. Safonov, A.A., Panasenko, O.I., Knysh, E.G., Varinsky, B.O. (2014). Synthesis and physicochemical properties of 4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol derivatives. *Collection of scientific works of the Ukrainian Military Medical Academy. Problems of military health*, 42, 381-385. [\[CrossRef\]](#)



STRUCTURAL AND PHARMACEUTICAL EVALUATION OF 4-HYDROXY-BENZAMIDE DERIVATIVE: ANTI-BACTERIAL AND ANTI-VIRAL POTENT

4-HİDROKSİ-BENZAMİD TÜREVİNİN YAPISAL VE FARMASÖTİK DEĞERLENDİRMESİ:
ANTI-BAKTERİYAL VE ANTI-VİRAL ETKİ

Aarthi Kundam VASUDEVAN ^{1,2} , Hemamalini RAJAGOPAL ¹ ,
Sambanthan MUTHU ^{3,4*} , Fazilath Basha ASIF ⁵ , Badiadka NARAYANA ⁶ 

¹Department of Physics, Queen Mary's College, Chennai, 600 004, Tamil Nadu, India

²University of Madras, Chennai, 600 005, Tamil Nadu, India

³Department of Physics, Arignar Anna Govt. Arts College, Cheyyar, 604 407, Tamil Nadu, India

⁴Department of Physics, Puratchi Thalaivar Dr. M. G. R. Govt. Arts and Science College,
Uthiramerur, 603 406, Tamil Nadu, India

⁵Department of Physics, Islamiah College (Autonomous), Vaniyambadi, 635 752, Tamilnadu, India

⁶Department of Chemistry, Mangalore University, Mangalagangothri, 574 199, Karnataka, India

ABSTRACT

Objective: *In medicinal chemistry, biochemical research and the drug distribution mechanism are crucial. Many common illnesses are caused by bacteria and viruses. The findings of this analysis may be very beneficial to the pharmacy and drug development processes.*

Material and Method: *Experimental UV-Vis spectroscopy was recorded and compared with the computed results. Reactive sites are analyzed using molecular electrostatic potential and dual descriptor's analysis. Toxicity and druglikeness parameters are explored. Docking study was performed using Autodock tool software.*

Result and Discussion: *Calculated C11-O19 bond length value is found as 1.226. Calculated band gap energy from molecular orbitals is 4.39 eV. Experimentally recorded and computationally predicted UV-VIS spectrum values are comparable with the biomaterial. Binding energy is computed as -6.18 and -5.36 from PL interaction studies. Hydrogen bonds are found between the title ligand and bacterial, viral protein receptors.*

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Sambanthan Muthu
e-mail / e-posta: mutgee@gmail.com, **Phone / Tel:** +919443690138

Keywords: DFT, Drug likeness, MEP, Molecular docking, Toxicity

ÖZ

Amaç: Medisinal kimyada biyokimyasal araştırma ve ilaç dağılım mekanizması çok önemlidir. Bakteri ve virüsler pek çok hastalığa neden olmaktadır. Bu çalışmanın bulguları eczacılık ve ilaç geliştirme süreçleri için çok faydalı olabilir.

Gereç ve Yöntem: Kaydedilen deneysel UV-Vis spektrumu hesaplanan sonuçlarla karşılaştırıldı. Reaktif bölgeler, moleküler elektrostatik potansiyeli ve ikili tanımlayıcılar analizi kullanılarak analiz edildi. Toksikite ve ilaç benzerliği parametreleri araştırıldı. Docking çalışması, Autodock programı kullanılarak gerçekleştirildi.

Sonuç ve Tartışma: Hesaplanan C11-O19 bağ uzunluğu değeri 1.226 olarak bulundu. Moleküler orbitallerin hesaplanan bant aralığı enerjisi 4.39eV'dir. Deneysel olarak kaydedilen ve hesaplanan tahmini UV-VIS spektrum değerleri, biyomateryal ile karşılaştırılabilir düzeydedir. Bağlanma enerjileri, PL etkileşim çalışmaları ile -6.18 ve -5.36 olarak hesaplandı. Başlık ligandı ile bakteriyel ve viral protein reseptörleri arasında hidrojen bağları bulundu.

Anahtar Kelimeler: DFT, İlaç benzerliği, MEP, Moleküler docking, Toksikite

INTRODUCTION

Amide derivatives are an important class of compounds in different biological activities [1]. N-[(Z)-(4-fluorophenyl)methylideneamino]-4-hydroxybenzamide (FBFBH) is a heterocyclic compound; mostly it is used in medicinal purposes like, antifungal, anticancer, anti-inflammatory, anticonvulsant, antioxidants and antiviral agents [2–5]. Hydroxy-benzamide derivatives have the immense applications in biological field and especially in anti microbial activities [6]. Anti fungal activity of the hydroxy-benzamide derivative was explored in earlier studies [7]. Related N-acetyloxy-2-hydroxybenzamide with oxidovanadium (IV) complexes was synthesized and reported for microbial potential studies [6]. Zinc sulfate studies are carried out on N-(2-pyridyl)-2-hydroxybenzamide were reported [8]. Hydroxy-benzamide was also reported in solution phase with Iron (III) complexes [9]. The empirical formula for the headline compound is $C_{14}H_{11}FN_2O_2$ and molecular weight of the FBFBH compound is 258.25.

In this present study, detailed work was done on structural, protein ligand interaction and pharmaceutical properties of anti bacterial and anti viral drug. Density functional theory [10] is implemented to find the reactive sites of the head line molecule. Chemical properties like electrophilic index, chemical softness is calculated. Electronic properties are calculated from molecular orbitals and compared with experimentally recorded band gap energy using UV-Vis spectroscopy. Toxic parameters were calculated. Protein ligand interaction study is explained.

MATERIAL AND METHOD

Experimental Details

The N-[(Z)-(4-fluorophenyl)methylideneamino]-4-hydroxybenzamide compound was procured from AVRA chemical synthesis. Using DMSO as a solvent, the UV-Vis absorption-spectrum was

recorded using spectrometer in the range between 200-600 nm. The spectral measurement was recorded at the Sophisticated Analytical Instrumentation Facility (SAIF), IIT, Chennai, India.

Computational Details

Structural properties were investigated using Gaussian 09W [11]. 6-311++G(d,p) basis was used [1]. Reactive sites are visualized using Gauss view tool. Pharmaceutical properties are calculated using Preadme online tool (<https://preadmet.bmdrc.kr/>). Protein receptors were screened using PASS online bioactivity server. Chosen proteins are downloaded from RCSB proteins database. Ligand was prepared from optimized structure of the headline molecule. Protein ligand interaction study is performed using Autodock 4.2.6. The computation of the atomic charges was done by Kollman and Gasteiger method after the polar hydrogen was attached. The active site of the protein was defined with 126 Å x 126 Å x 126 Å grid size, out the processes. H-bond interactions are visualized using PYMOL graphical interface tool [12].

RESULT AND DISCUSSION

Optimized Molecular Geometry

By optimizing the molecule structural properties of any chemical structure can be explored. Experimental crystal structure values of 4-hydroxy-benzamide compound are reported in earlier studies [13]. The computed parameters such as Bond length and bond angle are shown in Table 1. In the title compound there are 14 C-C bonds, 1 C=O bond, 1 C-O bond, 1 C-F bond, 1 N-N bond, 1 C-N bond and 2 C-N bonds. The calculated bond length of C2-C3, C2-C19, C3-C4, C3-H20, C4-C5, C4-H21, C5-C6, C5-C18, C6-N7, C6-H22, N7-N8, N8-C9, N8-H23, C9-C10, C9-O17 are 1.354, 1.385, 1.390, 1.392, 1.083, 1.401, 1.085, 1.463, 1.406, 1.280, 1.098, 1.355, 1.391, 1.016, 1.498 and 1.214 respectively. Optimized geometrical structure of the headline compound is shown in Figure 1.

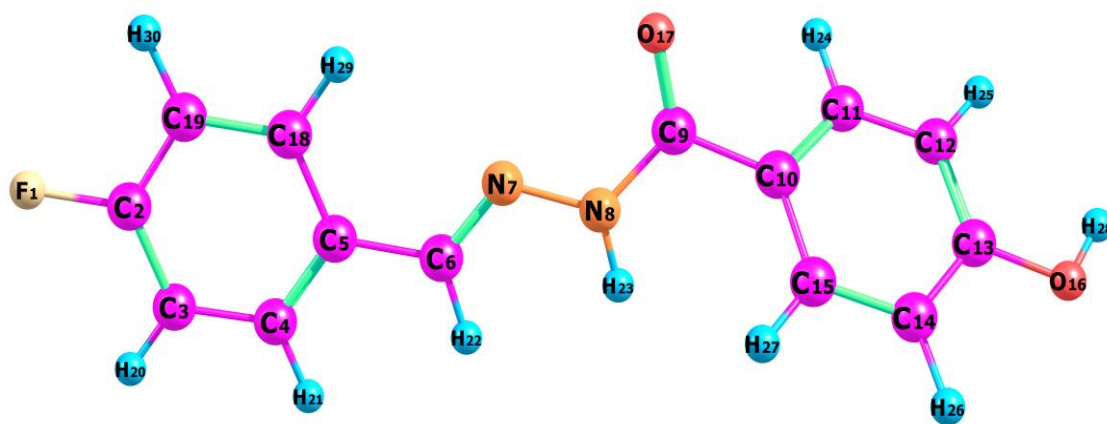


Figure 1. Geometric structure at lowest energy of the title compound

Table 1. Geometrical parameters of the title compound

Parameters	B3LYP/ 6-311++G(d,p)	Parameters	B3LYP/ 6-311++G(d,p)	Parameters	B3LYP/ 6-311++G(d,p)
Bond Length	(Å)	Bond Angle	(°)	Bond Angle	(°)
F1-C2	1.354	F1-C2-C3	118.9	C10-C15-C14	121.1
C2-C3	1.385	F1-C2-C19	118.8	C10-C15-H27	120.7
C2-C19	1.390	C3-C2-C19	122.4	C12-C11-H24	120.5
C3-C4	1.392	C2-C3-C4	118.3	C11-C12-C13	119.9
C3-H20	1.083	C2-C3-H20	119.9	C11-C12-H25	120.1
C4-C5	1.401	C2-C19-C18	118.8	C13-C12-H25	120.0
C4-H21	1.085	C2-C19-H30	119.6	C12-C13-C14	120.0
C5-C6	1.463	C4-C3-H20	121.8	C12-C13-O16	122.7
C5-C18	1.406	C3-C4-C5	121.1	C14-C13-O16	117.3
C6-N7	1.280	C3-C4-H21	119.2	C13-C14-C15	119.7
C6-H22	1.098	C5-C4-H21	119.7	C13-C14-H26	119.1
N7-N8	1.355	C4-C5-C6	119.4	C13-O16-H28	110.0
N8-C9	1.391	C4-C5-C18	118.9	C15-C14-H26	121.3
N8-H23	1.016	C6-C5-C18	121.7	C14-C15-H27	118.2
C9-C10	1.498	C5-C6-N7	122.0	C19-C18-H29	120.4
C9-O17	1.214	C5-C6-H22	116.6	C18-C19-H30	121.6
C10-C11	1.399	C5-C18-C19	120.6		
C10-C15	1.402	C5-C18-H29	119.0		
C11-C12	1.388	N7-C6-H22	121.4		
C11-H24	1.083	C6-N7-N8	117.5		
C12-C13	1.398	N7-N8-C9	121.1		
C12-H25	1.086	N7-N8-H23	119.2		
C13-C14	1.396	C9-N8-H23	119.2		
C13-O16	1.364	N8-C9-C10	114.3		
C14-C15	1.389	N8-C9-O17	122.9		
C14-H26	1.083	C10-C9-17	122.8		
C15-H27	1.084	C9-C10-C11	117.3		
O16-H28	0.963	C9-C10-C15	124.2		
C18-C19	1.387	C11-C10-C15	118.5		
C18-H29	1.083	C10-C11-C12	120.9		
C19-H30	1.083	C10-C11-H24	118.5		

Frontier Molecular Orbitals

The potential differential among HOMO - Lumo, defined as energy band gap, is crucial in deciding a molecule's electrochemical performance and reaction [14].

$$\text{Chemical potential } (\mu) = \frac{1}{2}(E_{\text{LUMO}} + E_{\text{HOMO}})$$

$$\text{Electronegativity } (\chi) = -\mu = -\frac{1}{2}(E_{\text{LUMO}} + E_{\text{HOMO}})$$

$$\text{Global hardness } (\eta) = \frac{1}{2}(E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}})$$

$$\text{Electrophilicity} = \frac{\mu^2}{2\eta}$$

$$\text{Softness } (S) = \frac{1}{\eta}$$

The computed HOMO–LUMO energies of the FBFBH compound are -6.3324 eV and -1.9424 eV respectively and other chemical parameters are shown in Table 2. Band gap Energy value is 4.39eV,

which is comparable to biologically active material and Electrophilicity index is 3.8993. Excited state surface of headline compound is shown in Figure 2.

The UV-vis spectrum of FBFBH was investigated experimentally with DMSO as a fluid and theoretical [15]. The static or dynamic variables of the chosen molecules in the higher states can be measured reliably using this TD-DFT. Table 3 shows that the wavelength of maximal absorption in theory and experiment is 321 and 261nm, overall. The highest wavelength value represents the number of electrons injected rings IEFPCM solvation model is implemented to study the solvent effect of head line molecule. The homo-lumo values and UV-Vis band gap values are compactable and which is comparable with bio active material [16]. The comparison spectra of experimental and theoretical data are shown in Figure 3.

Table 2. Important chemical parameters of the title compound

Parameters	Values
HOMO (eV)	-6.3324
LUMO (eV)	-1.9424
Ionization potential	6.3324
Electron affinity	1.9424
Energy gap (eV)	4.3900
Electronegativity	4.1374
Chemical potential	-4.1374
Chemical hardness	2.1950
Chemical softness	0.2278
Electrophilicity index	3.8993

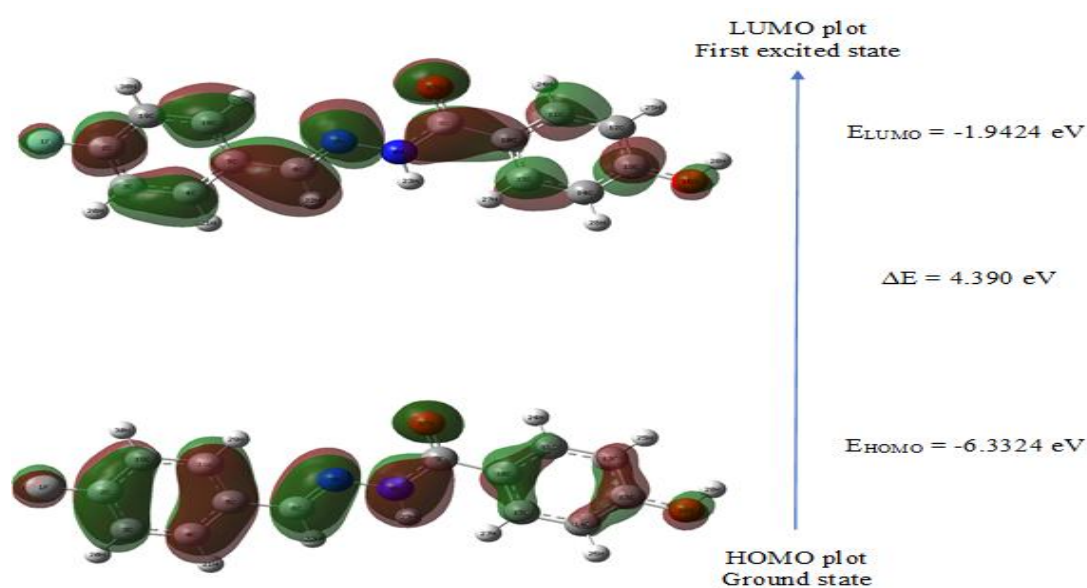


Figure 2. HOMO-LUMO energy values with surface of title compound

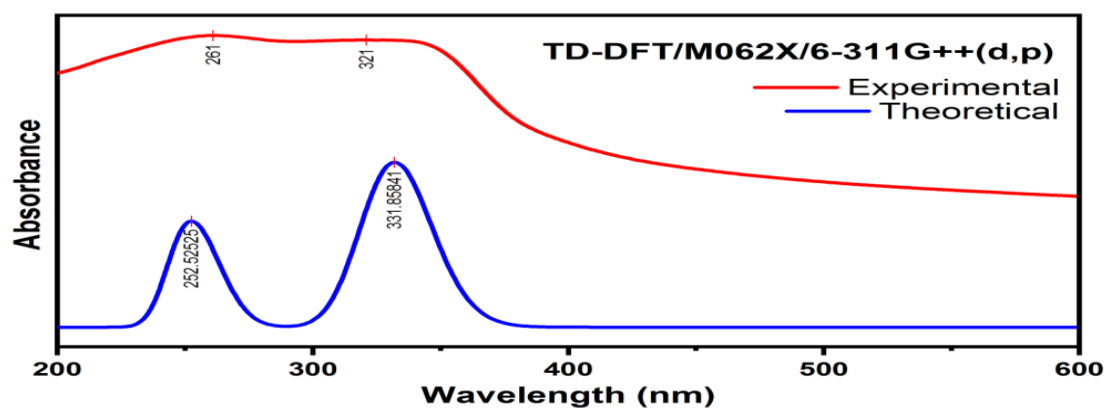


Figure 3. Recorded and computed UV-Vis comparison spectra of title compound

Table 3. Theoretically calculated values of title compound by TD-DFT procedure

No.	Energy(cm ⁻¹)	Wavelength (nm)	Osc. Strength	Symmetry	Major contribs
1	30141.74	331.7658	0.2317	Singlet-A	HOMO->LUMO (77%)
2	38429.09	260.2195	0.0624	Singlet-A	H-5->LUMO (24%), H-5->L+1 (15%), H-4->LUMO (32%)
3	40083.33	249.4802	0.1161	Singlet-A	H-6->LUMO (12%), H-3->LUMO (26%), HOMO->L+3 (14%)

Molecular Electrostatic Potential

MEP explores molecular shape, molecular size, and chemical reactivity by color grading [17]. The generated MEP map of FBFBH compound is shown in Figure 4. From the map, red colour reveals maximum negative electrostatic potential, blue colour shows maximum positive electrostatic potential whereas green indicates zero potential in the headline compound and the MEP surface is mapped in the range of -7.068×10^{-2} eV to 7.068×10^{-2} eV. From the results, maximum negative potential is on the carbonyl group which is indicated in red colour.

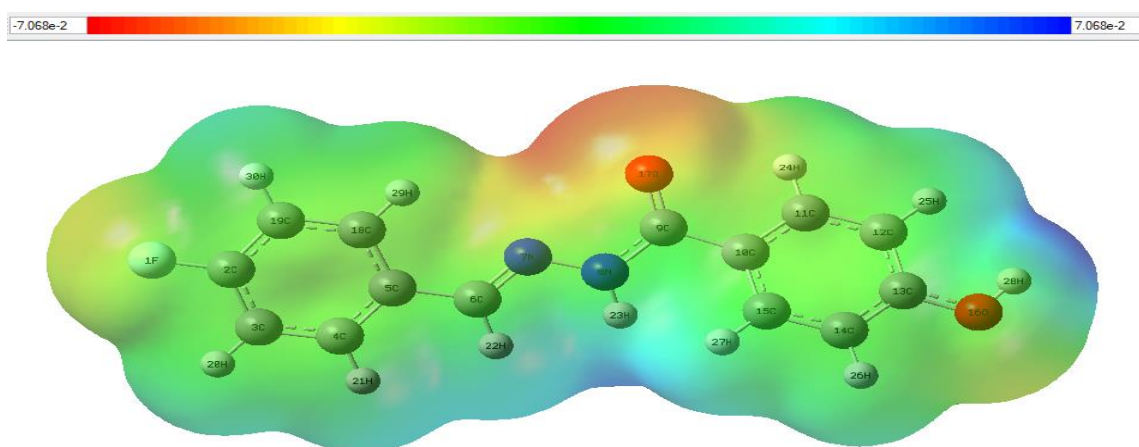


Figure 4. Molecular electrostatic potential surface of title compound

Dual Descriptor Analysis

Reactive sites of chemical structure can be analyzed from Mulliken charges by calculating Fukui functions and dual descriptors [18,19]. For the title compound, the negative Δf values are -0.02337, -0.02597, -0.06915, -0.04507, -0.00027, -0.00758, -0.02744, -0.0008, -0.02956, -0.03294, -0.01088, -0.00866, -0.00198, -0.01984, -0.00255 and the corresponding atoms of these values are C6, N7, C9, C11, C12, C13, C14, C15, O17, C18, H24, H25, H27, H28 and H30, respectively. These observed results reveal that O17=C9 atoms with -0.02956 is under electrophilic attack.

Drug Likeness

For the present study, various rules are implemented on the FBFBH compound to find if the compound violates any rule and results are studied [20]. The CMC like rule is qualified and has zero violations, Lead like rule is satisfactory, if binding affinity value is greater than 0.1 μM . MDDR like rule has mid structure range since there are no rings whereas the crucial Rule of Five (ROF) is satisfactory and there are no violations. WDI like rule comes under 90% cutoff and not violated. From these results, it shows FBFBH compound has adequate drug likeness properties, and it is desirable for drug discovery process.

ADME

ADME properties have vital role in drug development process, these parameters are studied for the FBFBH compound [21]. Blood brain barrier (BBB) permeability is 0.880911, Buffer solubility value is 34.3988, Caco2 value is 18.5044 and it is CYP 2C19, CYP 2C9 inhibitor. The HIA value is 92.24715, MDCK is 2.18067, PPB (Plasma protein binding) is 80.956947, Pure water solubility is 52.0311, Skin permeability is -3.51581, SKlogD and SKlogP value is 2.88487, SKlogS buffer is -3.8755. These obtained values fall under the limit and has an essential role in pharmaceutical development.

Toxicity

Concentration of drug can be identified from the toxic parameters [22]. For FBFBH compound, algae at value are 0.0546867 and Ames test is mutagen whereas hERG inhibition is at medium risk range. The important parameters like Carcino mouse is negative and dalphaat, medakaat, minnow at parameters values are 0.130129, 0.026422 and 0.0174972, respectively. TA10010RLI value is positive, TA100NA is negative, TA1535 10RLI is negative, TA1535NA is negative. Overall these values show the intoxic nature of the headline compound.

Ramachandran Plot

Ramachandran plot is used to determine the torsional angles that are allowed and gives insight into the peptide structures [23]. It unveils the phi-psi torsion angles for every residue in the chosen proteins namely 1R6A and 5OP9 which is shown in figure 5 and 6. From the figures, it can be observed that most of the amino acids are present in the darkest region illustrated here as red and only few are

spotted in the disallowed regions. This validates that the selected proteins are highly stable in nature and can be used to study protein ligand interactions.

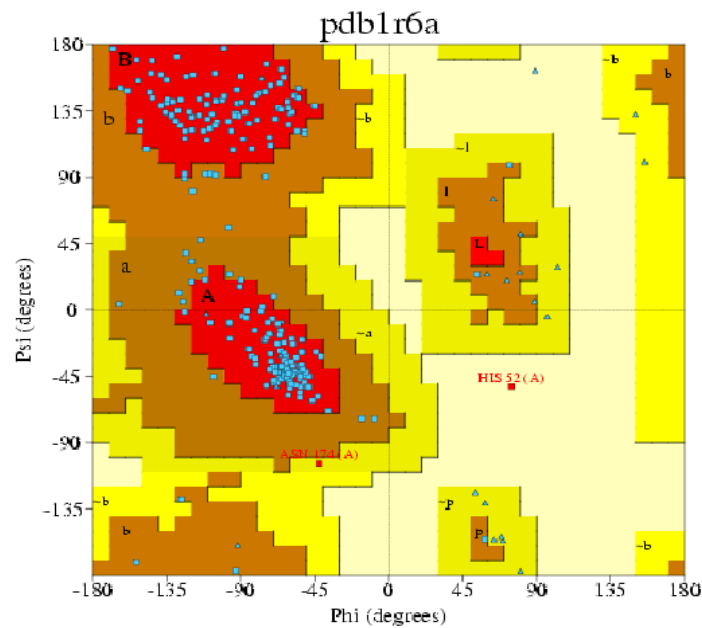


Figure 5. Ramachandran plot for 1R6A protein

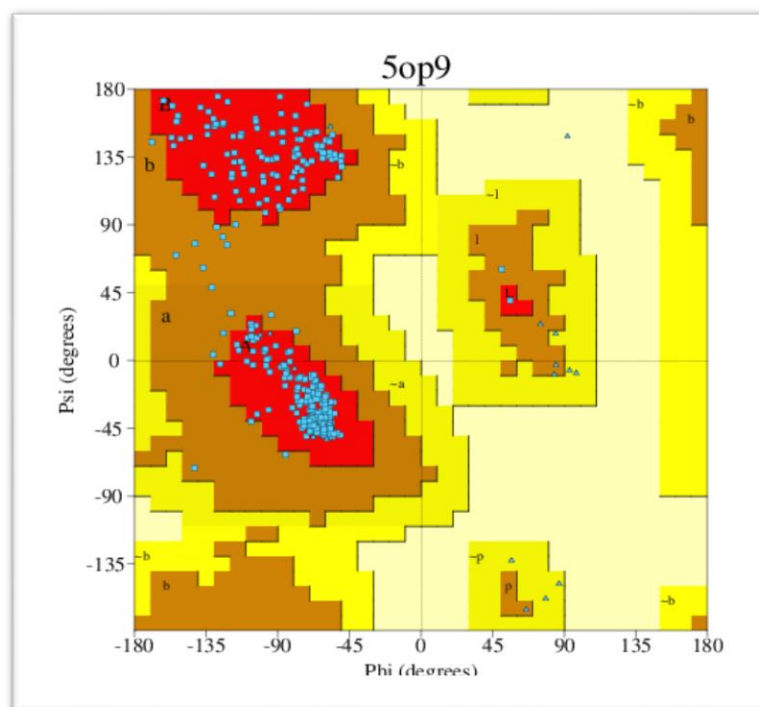


Figure 6. Ramachandran plot for 5OP9 protein

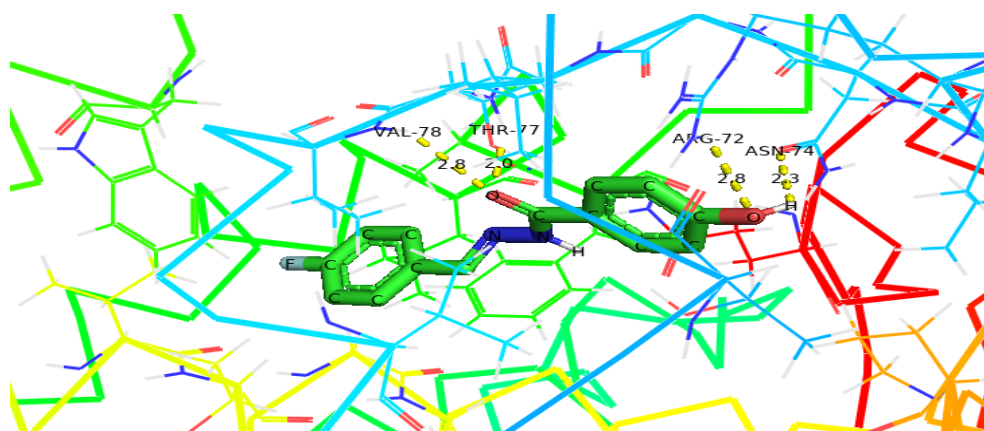
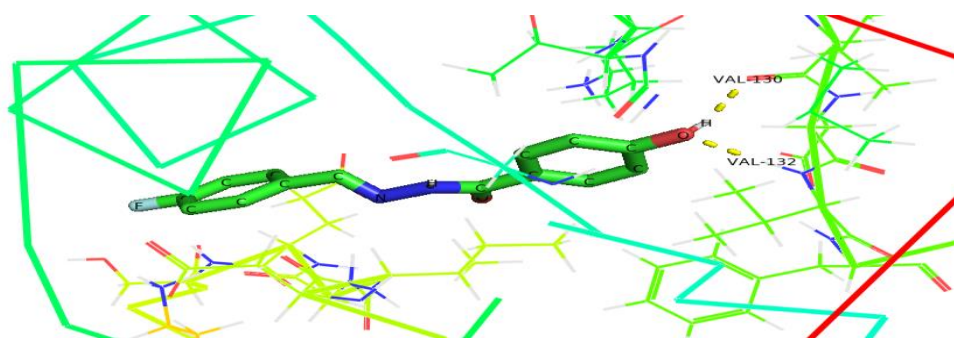
Molecular Docking

Molecular docking is very important in structural molecular biology, pharmacogenomics, and computer-assisted drug development. Binding energy can be calculated from docking processes. Molecular docking experiments assist us in determining the precise binding position of the protein and ligand [24, 25]. Docking study aids in finding the protein ligand binding interactions and also it reduce the cost and time in drug designing process and it is done using Autodock Tools [26–28]. Anti microbial activities, antimycobacterial tuberculosis and binding affinity were studied for receptor 5OP9. Twenty cytochrome P450 enzymes are encoded by Mycobacterium tuberculosis (CYPs or P450s). CYP121A1 is one of these, and it has been shown that it is needed for microbial viability. RMSD gradient for naturally occurred compounds were explained in previous studies [29]. In the current docking study, binding location of the chosen ligand and the proteins are investigated. Target proteins are 1R6A viral protein and 5OP9 mycobacterial protein are obtained from PDB. Chosen protein crystal structures were prepared using PYMOL interface. To obtain the optimized structure of the FFBFH ligand, it is docked into the active sites of the 1R6A, 5OP9 and 100 docking runs are executed to find the best fit binding sites with lowest binding energy. The estimated inhibition constants and binding energy values of PL interactions with 5OP9 and 1R6A receptor proteins are 29.68, 117.7 μ mand -6.18, -5.36 kcal/mol, respectively. The bonded residues, RMSD values are shown in Table 4. The binding orientations of 1R6A, 5OP9 proteins and FFBFH ligand are shown in Figure 7 and 8.

In this present work, we investigated the structural properties of FFBFH compound. The significant bonds in the FFBFH compound are N7-N8, N8-H23, C9=O17, O16-H28, F1-C2 and the corresponding bond length values are 1.355, 1.016, 1.214, 0.963, 1.354Å. From UV-vis spectral analysis, absorption maxima of observed and calculated values are 261 and 321nm. The FMO study supplied the theoretical justification for considering the chosen compound to be biologically active and the band gap energy of FFBFH compound is found to be 4.39eV. The reactive sites present in the compound are revealed from Dual descriptor analysis and O17=C9 atoms with -0.02956 is under electrophilic attack. Drug likeness, ADME and Toxicity studies validates that FFBFH compound is suitable for drug development process. Quantitative evaluation of 5OP9, 1R6A proteins is studied using Ramachandran plot, which shows the chosen proteins are structurally stable. The computed minimum binding energy values of ligand - 1R6A, 5OP9 the receptors proteins are -6.18 and -5.36 kcal/mol, respectively. Hence, this compound is predicted as a potential drug for bacterial disease and due to the formation of two hydrogen bond interactions with title compound, it might also be a drug candidate for viral (dengue) disease.

Table 4. H Bond interactions of FBFBH ligand with 1R6A and 5OP9 receptor proteins

Protein (PDB-ID)	Bonded residues	Bond distance (Å)	Estimated Inhibition constant (μm)	Binding energy (kcal/mol)	Intermolecular energy (kcal/mol)	Reference RMSD
5OP9 (Anti bacterial protein)	ASN 74/ UNL 1'H	2.3	29.68	-6.18	-7.37	267.821
	ARG 72/ UNL 1'O	2.8				
	VAL 78/ UNL 1'O	2.8				
	THR 77/ UNL 1'O	2				
1R6A (Antiviral protein)	VAL 130	1.9	117.7	-5.36	-6.55	43.01
	VAL 132	2				

**Figure 7.** H-Bond interaction of 5OP9 protein with FBFBH ligand**Figure 8.** H-Bond interaction of 1R6A protein with FBFBH ligand

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception: A.K.V., F.B.A.; Design: A.K.V., S.M., F.B.A.; Supervision: H.R., S.M., B.N.; Resources: H.R.; S.M., B.N.; Materials: A.K.V., F.B.A.; Data collection and/or processing: A.K.V., F.B.A.; Analysis and/or interpretation: H.R., S.M., B.N.; Literature search: A.K.V., F.B.A.; Writing manuscript: A.K.V., F.B.A.; Critical review: H.R., S.M., B.N.; Other (Figures): A.K.V., F.B.A.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Asif, F.B., Khan, F.L.A., Muthu, S., Raja, M. (2021). Computational evaluation on molecular structure (Monomer, Dimer), RDG, ELF, electronic (HOMO-LUMO, MEP) properties, and spectroscopic profiling of 8-Quinolinesulfonamide with molecular docking studies. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1198, 113169. [CrossRef]
2. Nisa, S., Yusuf, M. (2020). Synthesis and antimicrobial evaluation of varied ring new heterocycles. *Indian Journal of Chemistry -Section B (IJC-B)*, 59B, 420–430, from <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/54148/1/IJC-B%2059B%283%29%20420-430.pdf>
3. Rahuman, M.H., Muthu, S., Raajaraman, B.R., Raja, M. (2020). Quantum computational, spectroscopic and molecular docking investigations on 4-Acetylamino-benzoic acid methyl ester: A prospective anticancer drug. *Chemical Data Collections*, 26, 100352. [CrossRef]
4. Manikandan, V., Vanangamudi, G., Arulkumaran, R., Christuraj, P., Thirunarayanan, G. (2020). Antimicrobial potent (E)-2-(1-phenylethylidene)-1-tosylhydrazines. *Indian Journal of Chemistry -Section B (IJC-B)*, 59B, 399–405, from <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/54150/1/IJC-B%2059B%283%29%20399-405.pdf>
5. Joshi, R., Sharma, J., Pardasani, R.T. (2017). Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some 2,4-dibromo-1,5-dimorpholino/dipiperidino-pentane-3-ones. *Indian Journal of Chemistry -Section B (IJC-B)*, 56B, 183–191, from [http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/40520/1/IJC-B%2056B\(2\)%20183-191.pdf](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/40520/1/IJC-B%2056B(2)%20183-191.pdf)
6. Priya, B., Kumar, A., Sharma, N. (2020). Synthesis, characterization, and biological properties of oxidovanadium(IV) complexes of acetylsalicylhydroxamic acid (N-acetyloxy-2-hydroxybenzamide) as potential antimicrobials. *Journal of Chemical Research*, 44(7–8), 460–470. [CrossRef]
7. Ienascu, I.M.C., Balaes, T., Petre, C.V., Pop, R.O., Cata, A., Stefanut, M.N., Albu, P., Poenaru, M. (2018). Novel n-(2-bromo-phenyl)-2-hydroxy-benzamide derivatives with antifungal activity. *Revista de Chimie*, 69(7), 1876–1880. [CrossRef]
8. Garg, B.S., Bhojak, N., Bist, J.S., Singh, B.K. (1999). Micellar spectrofluorimetric

- determination of zinc (II) with N-(2'-pyridyl)-2-hydroxybenzamide. *Indian Journal of Chemistry - Section A Inorganic, Physical, Theoretical and Analytical Chemistry*, 38(4), 392–394. Retrieved from <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/15664/1/IJCA%2038A%284%29%20392-394.pdf>
9. Furia, E. (2017). Study of complexation equilibria between the iron(III) ion and 2-hydroxybenzamide in aqueous solution. *Journal of Solution Chemistry*, 46(8), 1596–1604. [\[CrossRef\]](#)
 10. Thamarai, A., Vadamar, R., Raja, M., Muthu, S., Narayana, B., Ramesh, P., Sevvanthi, S., Aayisha, S. (2020). Molecular structure conformational analyses, solvent-electronic studies through theoretical studies and biological profiling of (2E)-1-(3-bromo-2-thienyl)-3-(4-chlorophenyl)-prop-2-en-1-one. *Journal of Molecular Structure*, 1202, 127349. [\[CrossRef\]](#)
 11. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B.S. (Revision A.02). Gaussian 09, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
 12. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. (2015). *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8, Schrodinger LLC*.
 13. Hansen, L.K., Perlovich, G.L., Bauer-Brandl, A. (2007). 4-Hydroxybenzamide. *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online*, 63(5). [\[CrossRef\]](#)
 14. Kuruvilla, T.K., Muthu, S., Prasana, J.C., George, J., Sevvanthi, S. (2019). Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman), quantum mechanical and docking studies on methyl[(3S)-3-(naphthalen-1-yl)oxy]-3-(thiophen-2-yl)propyl]amine. *Journal of Molecular Structure*, 1175, 163–174. [\[CrossRef\]](#)
 15. Pandey, M., Muthu, S., Nanje Gowda, N.M. (2017). Quantum mechanical and spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, ¹H, ¹³C NMR, UV-Vis) studies, NBO, NLO, HOMO, LUMO and Fukui function analysis of 5-Methoxy-1H-benzo[d]imidazole-2(3H)-thione by DFT studies. *Journal of Molecular Structure*, 1130, 511–521. [\[CrossRef\]](#)
 16. Fathima Rizwana, B., Prasana, J.C., Muthu, S., Abraham, C.S. (2019). Molecular docking studies, charge transfer excitation and wave function analyses (ESP, ELF, LOL) on valacyclovir: A potential antiviral drug. *Computational Biology and Chemistry*, 78, 9–17. [\[CrossRef\]](#)
 17. Aayisha, S., Renuga Devi, T.S., Janani, S., Muthu, S., Raja, M., Hemamalini, R. (2019). Structural (PES), AIM, spectroscopic profiling (FT-IR, FT-Raman, NMR and UV), HOMO-LUMO and docking studies of 2,2-dimethyl-N-(2-pyridinyl)propanamide – a DFT approach. *Chemical Data Collections*, 24, 100287. [\[CrossRef\]](#)
 18. Jardínez, C., Vela, A., Cruz-Borbolla, J., Alvarez-Mendez, R.J., Alvarado-Rodríguez, J.G. (2016). Reduced density gradient as a novel approach for estimating QSAR descriptors, and its application to 1, 4-dihydropyridine derivatives with potential antihypertensive effects. *Journal of Molecular Modeling*, 22, 296. [\[CrossRef\]](#)
 19. Asif, F.B., Khan, F.L.A., Muthu, S., Raja, M. (2020). Elaborated molecular structure, molecular docking and vibrational spectroscopic investigation of N-((4-aminophenyl)sulfonyl)benzamide with Density functional theory. *Chemical Data Collections*, 31, 100609. [\[CrossRef\]](#)

20. Arulaabaranam, K., Mani, G., Muthu, S. (2020). Computational assessment on wave function (ELF, LOL) analysis, molecular confirmation and molecular docking explores on 2-(5-Amino-2-Methylanilino)-4-(3-pyridyl) pyrimidine. *Chemical Data Collections*, 29, 100525. [\[CrossRef\]](#)
21. Vijayakumar, V., Prabakaran, A., Radhakrishnan, N., Muthu, S., Rameshkumar, C., Isac Paulraj, E. (2019). Synthesis, characterization, spectroscopic studies, DFT and molecular docking analysis of N4, N4'-dibutyl-3,3'-diaminobenzidine. *Journal of Molecular Structure*, 1179, 325–335. [\[CrossRef\]](#)
22. Psimadas, D., Georgoulas, P., Valotassiou, V., Loudos, G. (2012). Molecular Nanomedicine Towards Cancer: *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(7), 2271–2280. [\[CrossRef\]](#)
23. Manjusha, P., Prasana, J.C., Muthu, S., Rizwana, B.F. (2020). Spectroscopic elucidation (FT-IR, FT-Raman and UV-visible) with NBO, NLO, ELF, LOL, drug likeness and molecular docking analysis on 1-(2-ethylsulfonyl-ethyl)-2-methyl-5-nitro-imidazole: An antiprotozoal agent. *Computational Biology and Chemistry*, 88, 107330. [\[CrossRef\]](#)
24. Yilmaz, S., Ataei, S., Yildiz, I. (2020). Molecular docking studies on some benzamide derivatives as topoisomerase inhibitors. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 44, 470–480. [\[CrossRef\]](#)
25. Thomas, R., Hossain, M., Mary, Y.S., Resmi, K.S., Armaković, S., Armaković, S.J., Nanda, A.K., Ranjan, V.K., Vijayakumar, G., Van Alsenoy, C. (2018). Spectroscopic analysis and molecular docking of imidazole derivatives and investigation of its reactive properties by DFT and molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Structure*, 1158, 156–175. [\[CrossRef\]](#)
26. Haruna, K., Kumar, V.S., Sheena Mary, Y., Popoola, S.A., Thomas, R., Roxy, M.S., Al-Saadi, A.A. (2019). Conformational profile, vibrational assignments, NLO properties and molecular docking of biologically active herbicide 1,1-dimethyl-3-phenylurea. *Heliyon*, 5(6), e01987. [\[CrossRef\]](#)
27. Al-Zaqri, N., Pooventhiran T., Alsalmeh A., Warad I., John A.M., Thomas R. (2020) Structural and physico-chemical evaluation of melatonin and its solution-state excited properties, with emphasis on its binding with novel coronavirus proteins, *Journal of Molecular Liquids*, 318, 114082. [\[CrossRef\]](#)
28. Pooventhiran, T., Bhattacharyya, U., Rao, D.J., Chandramohan, V., Karunakar, P., Irfan, A., Mary, Y.S., Thomas, R. (2020) Detailed spectra, electronic properties, qualitative non-covalent interaction analysis, solvatochromism, docking and molecular dynamics simulations in different solvent atmosphere of cenobamate, *Structural Chemistry*, 31, 2475–2485. [\[CrossRef\]](#)
29. Taban, I.M., Elshihawy, H., Torun, B., Zucchini, B., Williamson, C.J., Altuwairigi, D., Ngu, A., McLean, K.J., Levy, C.W., Sood, S., Marino, L.B., Munro, A.W., S. de Carvalho, L.P., Simons, C. (2017). Novel aryl substituted pyrazoles as small molecule inhibitors of cytochrome P450 CYP121A1: synthesis and antimycobacterial evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(24), 10257–10267. [\[CrossRef\]](#)



TÜRKİYE'DE DOĞAL OLARAK YETİŞEN *CELTIS AUSTRALIS* L. VE *C. TOURNEFORTII* LAM. (CANNABACEAE) MEYVELERİNİN YAĞ ASİTİ BİLEŞİMLERİ VE ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

*EVALUATION OF FATTY ACID COMPOSITIONS AND ANTIMICROBIAL EFFECTS OF *CELTIS AUSTRALIS* L. AND *C. TOURNEFORTII* LAM. (CANNABACEAE) NATURALLY DISTRIBUTED IN TURKEY*

Gülderen YILMAZ^{1*} , Gözde ÖZTÜRK² , Betül DEMİRCİ² 

¹Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, 06560, Ankara, Türkiye

²Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 26210, Eskişehir, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışma, Türkiye'de yetişen *Celtis australis* L. ve *C. tournefortii* Lam. meyve örneklerinin yağ asiti bileşenleri ve antimikrobiyal özelliklerini karşılaştırmak amacı ile yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem: *C. australis* ve *C. tournefortii* meyvelerinden Soxhlet aparatı ile elde edilen sabit yağ, metilleme işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen yağ asitlerinin bileşenleri GK ve GK/KS yöntemiyle eş zamanlı olarak analiz edilmiştir. Sabit yağ numunelerinin *in vitro* antimikrobiyal aktivite çalışmaları Gram negatif *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, Gram pozitif *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* NRRL B3711, *Propionibacterium acnes* ATCC 11827, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 700699 mikroorganizmalarına karşı CLSI mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak kloramfenikol kullanılmıştır. Minimum inhibisyon konsantrasyonları (mg/mL) belirlenmiştir.

Sonuç ve Tartışma: *C. australis* ve *C. tournefortii* meyvelerinde yağ asidi bileşenleri, sırasıyla linoleik asit (%74,8, %49,5), oleik asit (%10,8, %18,6) ve palmitik asit (%5,6, %8,8) olarak belirlenmiştir. Sonuçlar standart antimikrobiyal maddeler ile karşılaştırılmış ve MIC değerleri > 2,5-0,5 mg/mL belirlenmiştir. Sonuçların antimikrobiyal etkinlik açısından kayda değer olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal, *Celtis australis*, *Celtis tournefortii*, GK/KS, sabit yağ

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Gülderen Yılmaz
e-posta / e-mail: gulderen_yilmaz@yahoo.com, Tel./ Phone: +903122033187

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to compare the fatty acid components and antimicrobial properties of fruit samples of *Celtis australis* L. ve *C. tournefortii* Lam. naturally grown in Turkey.

Material and Method: The fixed oils were obtained from the fruits of *C. australis* and *C. tournefortii* by using Soxhlet apparatus, and then methylated. The components of the obtained fatty acids were analyzed simultaneously by GC and GC/MS. The in vitro antimicrobial activity of the fatty acid samples were determined against Gram negative *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 and Gram positive *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* NRRL B3711, *Propionibacterium acnes* ATCC 11827, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *Staphylococcus aureus* ATCC 700699 microorganisms using the CLSI microdilution method. Chloramphenicol was used as positive control. The minimum inhibition concentrations (mg/mL) were designated.

Result and Discussion: The unsaturated fatty acid in *C. australis* and *C. tournefortii* fruits were determined as linoleic acid (74,8%, 49,5%), oleic acid (10,8%, 18,6%) and palmitic acid (5,6%, 8,8%), respectively. Results were compared with standard antimicrobial agents and MIC values > 2,5-0,5mg mg / mL were determined. The results were found to be significant in terms of antimicrobial efficacy.

Keywords: Antimicrobial, *Celtis australis*, *Celtis tournefortii*, fatty acid, GC-MS

GİRİŞ

Günümüzde antibiyotiklere karşı artan direnç nedeniyle, bulaşıcı hastalıklarla mücadele giderek zorlaşmaktadır. Antimikrobiyal ilaç kaynağı ve yeni antimikrobiyal bileşiklerin keşfi üzerine araştırmalar hızla devam etmektedir. Yeni keşif çalışmalarında bitkiler, bitkilerden elde edilen ekstratlar ve bileşikler üzerinde biyolojik aktivite çalışmalarının yapılması son derece önemlidir. Bitkiler, ekstratlar ve elde edilen saf maddeler antibakteriyel, antifungal ve antiviral aktivite çalışmaları için kullanılmaktadır.

Cannabaceae (Kendirgiller) familyasında yer alan *Celtis* L. cinsi, ılıman ve tropikal bölgelerde yetişen, genellikle ağaç, nadiren çalı formunda, kışın yaprak döken türlerin yer aldığı bir cinstir. Kabuğu pürüzsüz, düz, çiçekleri çok eşeyli, meyvesi küre biçiminde, etli drupa olup, uzun saplı ve oldukça sert çekirdeğe sahiptir. *Celtis* cinsi dünyada 72, ülkemizde ise 3 tür ve 5 taksonla temsil edilmektedir: *C. australis* L. subsp. *australis*; *C. australis* L. subsp. *caucasica*; *C. planchoniana*; *C. tournefortii* Lam. [1-2].

C. australis L. 20-25 m boyunda, kışın yaprak döken, genç dalları kadifemsi tüylü ağaçlardır. Yaprakları 4-12(-15) x(2-)3-4(-5) cm, ovat-lanseolat şekilli, tabanı asimetrik, yaprak tepesi sivri uçlu-akuminat, yaprak kenarları belirgin dişli-serrattır. Yaprığın üst yüzü kısa sert, alt yüzü ise kadifemsi kahverengi-yeşil ya da grimsi yeşil renkli tüylerle kaplıdır. Yaprak sapı 1.5(-2) cm. Meyve küre şeklinde, etli bir drupa olup 9-12 mm çapındadır. Olgun meyve kahverenginden siyaha değişen renkleri ile diğer türlerden kolayca ayırt edilir. Olgun meyve sapı 3.5 cm uzunluktadır. Meyve çekirdeğinin yüzeyi ağısı ve buruşuktur. Çiçeklenme zamanı Mart-Mayıs aylarında olup, 50-1000 m arası yükseklikte yetişmektedir. Yayılışı Kuzey Batı Afrika, Güney Avrupa, Batı Kafkasya'dır (Batı Suriye ve Kıbrıs dâhil). Ülkemizde ise Marmara, Karadeniz ve Ege bölgesinde yayılış gösterir [3].

C. tournefortii Lam. türüne ait bireyler 6 m'ye kadar boylanabilen çalı veya küçük ağaç formunda kışın yaprak döken ağaçcıklardır. Genç dalları kısa tüylü, yaprakları 2-6 x 1,5-4,5 cm'dir. Yaprak tabanı genellikle asimetric bazen subkordat, yaprak tepesi sivri uçlu akut-akuminat; yaprak kenarları dişli serrat-dentattır. Yaprığın alt yüzü kısa sert tüylü, mat yeşil renklidir. Olgun meyve sarı-turuncu renkli, küre şeklinde 9-12 mm çapındadır. Meyve sapı kısa 0.5-1.5 (-2) cm. meyve çekirdeği hemen hemen düz 4 çizgilidir. Çiçeklenme zamanı Mart-Nisan aylarında olup 300-1500 m yüksekliklerde rahatlıkla yetişmektedir. Tip örneği Erzincan olup, Sicilya, Balkanlar, Girit, Kuzey Irak, Batı İran, Güney Kafkasya'da yayılış gösterir. Ülkemizde ise Marmara, Ege, Doğu Anadolu ve Akdeniz bölgesinde yayılış gösterir [3].

İngilizcesi hackberry olan *Celtis* cinsine ülkemizde çıtak, çıtlık, çitemek, çitemik, çitlembik, çitlenbek, dadağan, dagum, dağ dağan, dağan, dağdığan, dardağan, dardahan, davılga, davın, davum, dogun, doğdoğan, gıngires, gıngirez, ılıç, melengiç ve yabancı kiraz olarak adlandırılmaktadır [4-9].

Anadolu halk tıbbında *Celtis* meyveleri gıda olarak, meyve ve yaprakları, soğuk algınlığında, grip, nefes darlığında, öksürük, mide ülserlerinde, hazım kolaylaştırıcı ve ishale karşı kullanılmaktadır [4,8-11]. Geleneksel tıpta çok çeşitli kullanışları bulunmaktadır. *C. australis* ağacının kabuğundan elde edilen macun, kemik kırığı, burkulma ve eklem ağrılarında, yaprak ve meyvelerin, adet görememe, ağır adet kanaması, ishal, dizanteri ve peptik ülserlerin tedavisinde kullanılmaktadır [5-7,12-13]. Astım, sindirim güçlüğü, ödem, hipertansiyon, kardiyovasküler problemler, böbrek hastalıkları, kanser, diyabet, egzama ve eklem ağrıları gibi birçok hastalığın tedavisinde farklı *Celtis* türleri kullanılmaktadır [14].

Celtis cinsinin bazı türleri üzerinde yapılan fitokimyasal araştırmalarda flavonoidler, terpenoidler, kumarinler, kumaroil tiraminler, lignan glikozitler, steroidler, fenolikler, tanenler, saponinler ve alkaloidlerin varlığına rastlanmıştır [14-16].

Celtis meyveleri Na, K, P, Mn, Ca, B, Ba, Mg ve Se ana mineraller bakımından zengin olduğu ve yarfıstığı, kuşburnu, mersin (*Myrtus communis* L.) meyveleri ile kıyaslandığında Na, K, P, Ca, Mg, Mn ve Zn içeriklerinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (5,17-18). Olgun *Celtis* meyveleri üzerinde yapılan bir çalışmada kül, ham petrol, ham enerji, ham lif, ham protein ve mineraller (Na, P, K, Ca, Mn, B, Ba, Se, vb.) içerikleri de belirlenmiştir [5]. Yapılan bir başka çalışma ile *C. tournefortii* meyvelerinin besin elementleri, organik asitler, C vitamini, şeker içeriklerini belirlemiştir. Ayrıca meyvelerin çeşitli kısımlarından yağ asitleri elde edilmiş, yağ asitleri ve tokoferol miktarlarını da belirlemiştir [7]. Öztürk ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada, 2004-2007 yılları arasında İstanbul'un 40 farklı bölgesinden topladıkları *C. australis*' in yaprak, dal, kabuk numuneleri ile yetiştikleri topraklardan örnekler alınarak, bu bitkinin ağır metal kirliliğinde biyomonitör olarak kullanılabilirliğinin araştırmışlardır. *C. australis*' in başta bakır olmak üzere kullanışlı bir biyomonitör olduğunu ve ayrıca kabukların özellikle uzun dönemli ağır metal kirliliği ölçümünde kullanılabilirliği sonucuna

varmışlardır [19]. Slovenya’da yapılan bir araştırmada, *C. australis* tohumunun yağ asitleri ve şeker içeriğini (%81,5) tespit etmişlerdir. Ayrıca olgun ve olgun olmayan meyvelerin, sulu, etanolü ekstralarının total fenol miktarı araştırılmış, antioksidan, antimikrobiyal ve antifungal aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir [13].

C. australis’in yaprakları gri-yeşil renkli, gövdenin zarif, dekoratif olmasının yanında kuraklığa ve parazitlere karşı dayanıklı nedeniyle özellikle şehir park ve bahçelerinde süs bitkisi olarak tercih edilmektedir. Etli sulu meyvelerinin başta kuş türleri olmak üzere çeşitli hayvanlar tarafından tüketildiği bildirilmiştir [4,6-7,20]. *Celtis* türlerinin odununun dayanıklı ve esnek olmasından dolayı, ahşap, süsleme malzemesi, kasnak, yayık sopası, kaşık, baston, kürek, tarım aletleri yapımı, inşaatlarda, oymacılıkta ve kâğıt yapımında kullanılmıştır [21].

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Ankara ve Tunceli illerinde doğal olarak yayılış gösteren iki *Celtis* türlerinin yağ asitleri bileşenleri karşılaştırmak amacı ile yapılmıştır. Ayrıca sabit yağ numunelerin Gram negatif *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, Gram pozitif *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* NRRL B3711, *Propionibacterium acnes* ATCC 11827, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 700699 karşı *in vitro* antimikrobiyal aktivitesi, CLSI mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Bitkilerin yapraklı ve meyveli dal örnekleri alınmış, herbaryum örnekleri hazırlanmıştır. Herbaryum örnekleri Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumuna (AEF) kayıt edilip, herbaryum numarası alındıktan sonra dolaplara yerleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan türlerin toplandığı yerler ve herbaryum (AEF) numaraları Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışma materyallerin AEF numarası ve Toplandığı yerler

Tür adı	Toplandığı Yer	Toplandığı Tarih	Herbaryum Numarası
<i>C. australis</i> L.	Ankara, Çankaya	10.10.2017	AEF 27032
<i>C. tournefortii</i> Lam.	Tunceli, Batman Köyü	21.10.2015	AEF 26732

Bitkisel materyallerinin ekstraksiyonu

Bitki numuneleri gölgede kurutulup, toz edilip tartıldıktan sonra Soxhlet apareyi kullanarak sabit yağları elde edilmiştir. *C. australis*’in verimi % 43,1, *C. tournefortii* ise % 42,8 dir. Elde edilen sabit yağlar metilleme işlemi yapıldıktan sonra GK ve GK/KS yöntemiyle eş zamanlı olarak analizleri gerçekleştirilmiştir [22-23].

Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) ile Uçucu Yağın Kimyasal Analizi

Örneklerin GK ve GK/KS sistemi ile eş zamanlı olarak analizleri gerçekleştirilmiştir. GK/KS sistemi ile bileşenlerin kütle spektrumları alınarak tespitleri yapılmış; GK/AID dedektörü ile de tespit edilen bileşiklerin bağıl yüzdeleri hesaplanmıştır. Değerlendirme işlemleri "Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi" yanı sıra Wiley GC/MS Kütüphanesi ve Mass Finder Software 4.0 Kütüphane Tarama Yazılımları kullanılarak yapılmıştır [24].

GK Analiz Koşulları

Sistem :Agilent 6890N GK
Kolon :HP-Innowax (60m x 0.25mm Ø, 0.25 µm film kalınlığı)
Taşıyıcı Gaz :Helyum (0,8 mL dk⁻¹)

Sıcaklıklar
Enjeksiyon :250°C
Kolon :60°C'de 10 dk, 4°C dk artışla 220°C'ye, 220°C'de 10 dk, 1°C dk artışla 240°C'ye
Detektör :300°C, FID (Alev iyonizasyon dedektörü)

GK/KS Analiz Koşulları

Sistem :Agilent 5975 GC-MSD
Kolon :HP-Innowax (60m x 0.25mm Ø, 0.25 µm film kalınlığı)
Taşıyıcı Gaz :Helyum (0,8 mL dk⁻¹)
Sıcaklıklar
Enjeksiyon :250°C
Kolon :60°C'de 10 dk, 4°C dk artışla 220°C'ye, 220°C'de 10 dak, 1°C dk artışla 240°C'ye
Split Oranı :40:1
Elektron Enerjisi:70 eV
Kütle Aralığı :35-450 m/z

Mikroorganizma Kültürlerinin Geliştirilmesi

Antimikrobiyal aktivitenin değerlendirilmesi için kullanılan *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Propionibacterium acnes* ATCC 11827, *Bacillus cereus* NRRL B3711, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 700699, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ATCC (American Type Culture Collection) ve NRRL (Agricultural Research Service Culture Collection) liyofilize halde temin edilmiştir.

-85°C'de ve -20°C'de saklanan bakteriyel kültürler canlandırılmak üzere Mueller Hinton Agar (MHA) ve Mueller Hinton Broth (MHB) 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra türbidometre ile Mc Farland No: 0.5 tüpüne göre mikroorganizmaların kültür yoğunlukları ayarlanmıştır [25-26].

Her örneğin potansiyel antibakteriyel aktivitesi, modifiye edilmiş bir Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) yöntemine göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile değerlendirilmiştir. *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Propionibacterium acnes* ATCC 11827, *Bacillus cereus* NRRL

B3711, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 700699 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 şusları kullanılmıştır. Numuneler (20-0.019 mg / mL), başlangıç stok çözeltilisi için steril dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülmüştür.

Mikrodilüsyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Çalışmada 96 kuyucuklu mikrolakalara 100 uL numune uygulanmış ve 2 kat seri seyreltmeler yapılmıştır. Seyreltmelerden sonra, 50 uL tübidometrik olarak ayarlanmış mikroorganizma kısımları plakalara aşılanmıştır (10^5 - 10^6 CFU / mL).

Antibakteriyel Aktivite Çalışması

37° C'de 24 saat süreyle inkübasyondan sonra, birinci kuyucuk, 20 uL resazurin ile muamele edilmiş; tüm mikrolakalar üzerinde Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MIİK) belirlenmiştir. Standart antibiyotik kloramfenikol (128-0,25 ug / mL) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Tüm test örnekleri için antibakteriyel deneyler en az üç kez tekrarlanmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, *Celtis australis* ve *C. tournefortii* meyvelerinden sabit yağ elde edilmiştir. *C. australis* meyvelerinin sabit yağ oranı % 43,1; *C. tournefortii* meyvelerinin sabit yağ oranı ise % 42,8 dir. Bu iki *Celtis* türün sabit yağ miktarları birbirlerine yakın olduğu görülmüştür. *C. australis*'in doymuş yağ asiti yüzdeleri palmitik asit %5,6, stearik asit %3,1 iken *C. tournefortii* de bu oran biraz daha yüksek olup palmitik asit % 8,8, stearik asit % 3,9'dur.

C. australis meyvelerinde en yüksek miktarda doymamış yağ asitleri ise linoleik asit %74,8, oleik asit % 10,8 bulunurken *C. tournefortii* türünde linoleik asit %49,5 oleik asit %18,6 olarak belirlenmiştir. Çalışmamız sonunda GK ve GK/KS yöntemiyle eş zamanlı olarak yapılan analizleri sonuçları Tablo 2'de verilmiştir.

Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Çalışmamızın bu kısmında, Türkiye'de doğal olarak yetişen *Celtis tournefortii* ve *C. australis* meyvelerinden elde edilen sabit yağlarının antimikrobiyal etkilerinin değerlendirilmesi yapılmıştır. Sabit yağ numunelerinin *in vitro* antimikrobiyal aktivite çalışmaları, Gram(-) (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311) ve Gram(+) (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* NRRL B3711, *Propionibacterium acnes* ATCC 11827, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 700699) bakterilerle CLSI mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar standart bir antimikrobiyal ajanlar ile karşılaştırılmış ve MIC değerleri > 2,5-0,5 mg /ml belirlenmiştir.

İki yağ asitinin oranları ve içeriklerinin birbirine yakın olmasından dolayı antimikrobiyal aktive sonuçları da benzer ve standart antibiyotiğe kıyaslandığında aktivitesinin düşük olduğu görülmüştür.

Mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak *C. tournefortii* ve *C. australis* meyve sabit yağlardan antimikrobiyal aktivite çalışması tarafımızdan ilk defa yapılmıştır. Sonuçların antimikrobiyal etkinlik açısından kayda değer olduğu görülmüştür.

Tablo 2. *C. australis*, *C. tournefortii* yağ asidi bileşenleri

Bileşenler	<i>C. australis</i> (%)	<i>C. tournefortii</i> (%)
Palmitik asit (16:0)	5,6	8,8
Stearik asit (18:0)	3,1	3,9
Oleik asit (18:1)	10,8	18,6
Elaidik asit (18:1)	1,1	0,6
Linoleik asit (18:2)	74,8	49,5
Linolenik asit (18:3)	1,3	tr
Arachidik asit (20:0)	1,0	0,6
Behenik asit (22:0)	tr	1,2
Doymamış yağ asitleri	9,7	14,5
Doymuş yağ asitleri	88,0	68,7
Toplam	97,7	83,2
Doymuş/Doymamış yağ asitleri	9,07	4,73

FID verilerinde % hesaplama Eser (< %0,1)

Tablo 3. Numunelerin (mg/mL) ve antimikrobiyallerin (µg/mL) mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen minimum inhibitör konsantrasyonları

Mikroorganizmalar	<i>C. australis</i>	<i>C. tournefortii</i>	Kloramfenikol
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	25,0	25,0	4,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	25,0	25,0	4,0
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	25,0	25,0	4,0
<i>Bacillus cereus</i> NRRL B3711	>25,0	>25,0	4,0
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827	>25,0	>25,0	1,0
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	>25,0	>25,0	1,0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 700699	>25,0	>25,0	0,5

Keser ve ark. yaptığı bir çalışmada *C. tournefortii* meyvelerinin sulu, etanollü ve metanollü ekstraktlarının güçlü antiradikal, antimikrobiyal ve antiproliferatif özellikler sergilediğini tespit etmişlerdir. Bu etkinin bitkinin fitokimyasal içeriğinden kaynaklanıyor olabileceği sonucuna varmışlar ve meyvenin beslenme amaçlı tüketilebileceği belirtmişlerdir [27]. Özrenk ve ark., *C. tournefortii* meyvelerinin yağ asitleri, tokoferol, organik asit, şeker, C vitamini, besin elementleri içerikleri belirlemeyi amaçlamışlardır [7]. Yapılan bu çalışmada *C. tournefortii* meyvelerinin kabuk kısmındaki linoleik asit miktarı % 64,93, oleik asit miktarı % 23,54, palmitik asit miktarı % 6,02, stearik asit miktarı % 2,78 olarak tespit edilmiştir. Meyvenin mezokarpının linoleik asit miktarı % 72,72, oleik asit miktarı % 17,18, palmitik asit miktarı % 5,42, olarak saptanmıştır. Meyvenin iç kısmı çekirdeğine bakıldığında oleik asit miktarı % 64,47, linoleik asit miktarı % 17,68, palmitik asit miktarı % 9,2, stearik asit miktarı % 4,11 olduğunu tespit etmişlerdir [7].

Badoni ve ark., Hindistan'nın Tehri-Uttarakhand bölgesinde yetişen *Celtis australis* meyvelerinden elde ettikleri sabit yağların yağ asitleri bileşimlerini GC-MS ile analiz etmişler ve metil oleat (%25,7), metil palmitat (%22,2), metil trikozanoat (%13,3), metil lineolat (%7,8), metil dotriasetanoat (%2,6), metil 14-asetilhidroksipalmitat (% 2,1) başlıca yağ asitleri olarak tespit edilmiştir [16]. Meyvelerden elde edilen etanollü ekstraktların *P. auroginosa* ve *E. coli* mikroorganizmalarına karşı da anlamlı sonuç elde ettiklerini bildirmişlerdir [16].

Adedapo ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise *C. africana* türünden yaprak ve dallarından elde edilen metanol ekstraktlarının antioksidan etki ve fenolik bileşikler değerlendirilmiş ve sonuçta *C. africana* türünün tıbbi potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir [15]. Al-Tawell ve ark. tarafından *C. africana* türünden izole edilen üç fenolik amidin, anti-enflamatuar, antioksidan ve asetilkolinesteraz enzim inhibitör aktiviteleri değerlendirilmiş ve bu bileşiklerin, güçlü anti-enflamatuar ve antioksidan potansiyel ve orta derecede asetilkolinesteraz enzim inhibisyon aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir [28].

Celtis australis üzerinde yapılan bir başka çalışmada, tohumlarında %76,25 linoleik asit, %14,18 oleik asit, % 6,72 palmitik asit ve % 2,81 stearik asit belirlenmiştir. Ayrıca *C. australis*'in meyve ve yapraklarından elde ettikleri sulu ve etanollü ekstraktların antimikrobiyal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir [13].

Bizim yaptığımız bu çalışmada, meyvenin tümü analiz edilmiş, *C. australis* meyvelerinde doymamış yağ asitleri olarak linoleik asit %74,8, oleik asit %10,8 bulunurken, *C. tournefortii* türünde linoleik asit %49,5 oleik asit %18,6 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak *C. australis* ve *C. tournefortii* meyvelerinin sabit yağ açısından özellikle doymamış yağ asitlerince zengin olduğu, yaptığımız çalışma ile belirlenmiştir. Sonuçlar standart antimikrobiyal ajan olarak Kloramfenikol ile karşılaştırıldığında MİK değerleri > 25-0,5 mg/ml belirlenmiş ve pozitif kontrole göre düşük bulunmuştur. Fakat sonuçların antimikrobiyal etkinlik açısından kayda değer olduğu görülmüştür. *C. tournefortii* ve *C. australis* meyve sabit yağlardan mikrodilüsyon yöntemi antimikrobiyal aktivite çalışması tarafımızdan ilk defa yapıldığından dolayı elde edilen sonuçlar kayda değer olarak değerlendirilebilir. Sonuç olarak *Celtis* türlerinin zengin fitokimyasal içeriği ve farklı biyolojik aktivitelere sahip olduğu için potansiyel bir antimikrobiyal ajan olarak değerlendirilebilir. Meyvenin geleneksel kullanımının yanında beslenme amaçlı tüketilmesi yaptığımız çalışma ile desteklenmektedir. Bu nedenle meyvenin beslenme amaçlı tüketimini önermekteyiz. Daha ileriki çalışmalarda Türkiye'de yetişen diğer *Celtis* taksonları üzerinde çalışılarak birbirleri ile kıyaslamalarının yapılması planlanmaktadır.

YAZAR KATKILARI

Kavram: G.Y., B.D.; Tasarım: G.Y., B.D.; Denetim: G.Y., B.D., G.Ö.; Kaynaklar: G.Y., B.D., G.Ö.; Malzemeler: G.Y., B.D., G.Ö.; Veri toplama ve/veya işleme: G.Y., G.Ö.; Analiz ve/veya

yorumlama: G.Ö., B.D.; Literatür taraması: G.Y., G.Ö.; Makalenin yazılması: G.Y., B.D., G.Ö.; Kritik inceleme: G.Y., B.D., G.Ö.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

1. The Plant List Version 1.1. Web site (2013). Retrieved January 1, 2020, from <http://www.theplantlist.org/>. Erişim tarihi: 20.05.2021.
2. Güner, A. (2012). Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler) Nezhat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları Flora Dizisi, İstanbul, p. 312-313.
3. Davis P.H. (1982). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 7, Edinburgh University Press, Edinburgh, p. 649-652.
4. Baytop T. (1999). Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
5. Demir, F., Doğan, H., Özcan, M., Haciseferoğulları, H. (2002). Nutritional and physical properties of hackberry (*Celtis australis* L.). *Journal of Food Engineering*, 54(3), 241–247. [\[CrossRef\]](#)
6. Yücedağ, C., Gültekin, H.C. (2008). Adi Çitlembik (*Celtis australis* L.) ve Doğu Çitlenbiği (*Celtis tournefortii* Lam.) tohumlarının çimlenmesi üzerine araştırmalar. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12(3), 182-185. [\[CrossRef\]](#)
7. Özrenk, K., Gündoğdu, M., Türkoğlu, N., Şensoy, G.R.İ. (2012). Erzincan yöresinde doğal olarak yetişen doğu çitlembiği (*Celtis tournefortii* Lam.) meyvelerinin bazı kimyasal özellikleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 22(1), 26-32.
8. Tuzlacı, E. (2006). Şifa Niyetine, Türkiye’nin Bitkisel Halk İlaçları, Alfa Yayınları, İstanbul.
9. İkinci, A., Şimşek, M., Gülsoy, E. (2018). Çitlembik bitkisinin kimyasal bileşimi ve insan sağlığı üzerine etkileri, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(3), 21-30. [\[CrossRef\]](#)
10. Kültür, Ş., Altınbaşak, O., Anıl, S., Melikoğlu, G. (2018). Türkiye’de mide ülserinde kullanılan tıbbi bitkiler, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 22(1), 1-14. [\[CrossRef\]](#)
11. Fidan, M.S., Komut, O., Öz, M., Yaşar, M. (2011). The Medical Herbs in Gumushane Flora and the Applicable Fields, 2nd International Non-Wood Forest Products Symposium 8-10 September, Isparta/Turkey.



12. Ahmad, S., Rajendra, S., Surabhi, M., Ankur, G. (2012). Antibacterial activity of *Celtis australis* by invitro study, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 629-631.
13. Ota, A., Višnjevec, A.M., Vidrih, R., Prgomet, Ž., Necemer, M., Hribar, J., Cimerman, N.G., Možina, S.S., Bucar-Miklavcic, M., Ulrih, N.P. (2017). Nutritional, antioxidative and antimicrobial analysis of the Mediterranean hackberry (*Celtis australis* L.). *Food Science & Nutrition*, 5(1), 160-170. [\[CrossRef\]](#)
14. Gecibesler, I.H. (2019). Antioxidant activity and phenolic profile of Turkish *Celtis tournefortii* *Chemistry of Natural Compounds*, 55(4), 738-742. [\[CrossRef\]](#)
15. Adedapo, A., Florence, F.O., Afolayan, A.J., Masika, J.P. (2009). Antioxidant properties of the methanol extracts of the leaves and stems of *Celtis africana*. *Records of Natural Products*, 3, 23-31.
16. Badoni, R., Semwa, D.K., Rawat, U. (2010). Fatty acid composition and antimicrobial activity of *Celtis australis* L. fruits. *Journal of Scientific Research*, 2(2), 397-402. [\[CrossRef\]](#)
17. Baryeh, E.A. (2001). Physical properties of bambara groundnuts. *Journal of Food Engineering*, 47(4), 321-326. [\[CrossRef\]](#)
18. Demir, F., Doğan, H., Özcan, M., Haciseferoğullari, H. (2002). Nutritional and physical properties of hackberry (*Celtis australis* L.). *Journal of Food Engineering*, 54(3), 241-247. [\[CrossRef\]](#)
19. Öztürk, A. (2008). Doktora Tezi. *Celtis australis* L. (Ulmaceae)'in ağır metal kirliliği için biyomonitör olarak kullanılması. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
20. Yaltırık, F. (1998). Dendroloji Ders Kitabı II, Angiospermae (Kapalı Tohumlular), İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi, İstanbul.
21. Güney, D., Turna, İ., Atar F. (2018). The effects of different pretreatments on germination of Mediterranean hackberry (*Celtis australis* L.) seeds. *Biological Diversity and Conservation*, 11(1), 61-67.
22. Yılmaz, G., Ekşi, G., Demirci, B., Demirci, F. (2020). Chemical characterization of the fatty acid compositions and antimicrobial activity of sumac (*Rhus Coriaria* L.) fruits, growing naturally in Turkey and sold in herbalist markets. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 44(1), 61-69. [\[CrossRef\]](#)
23. Kılıç, C.S., Aslan, S., Kartal, M., Coşkun, M. (2007). *Capsella Bursa-Pastoris* (L.) medik (Cruciferae) tohumlarının ve köklerinin sabit yağ içerikleri açısından karşılaştırılması. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 36(1), 1-7. [\[CrossRef\]](#)
24. Demirci, F., Bayramiç, P., Göger, G., Demirci, B., Başer, K.H.C. (2015). Characterization and antimicrobial evaluation of the essential oil of *Pinus pinea* L. from Turkey. *Natural Volatiles and Essential Oils*, 2(2), 39-44.
25. Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2. (2002). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Second Edition, CLSI document, 22(15).

26. Clinical and Laboratory Standards Institute M7-A7. (2006). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Seven Edition, CLSI document, 26(2).
27. Keser, S., Keser, F., Kaygili, O., Tekin, S., Turkoglu, İ., Demir, E., Türkoglu, S., Karatepe, M., Suleyman, Sandal, S., Kirbağ, S. (2017). Phytochemical compounds and biological activities of *Celtis tournefortii* fruits. *Analytical Chemistry Letters*, 7(3), 344-355. [\[CrossRef\]](#)
28. Al-Taweel, A.M., Perveen, S., El-Shafae, A.M., Fawzy, G.A., Malik, A., Afza, N., Iqbal, L., Latif, M. (2012). Bioactive Phenolic Amides from *Celtis africana*. *Molecules*, 17(3), 2675-2682. [\[CrossRef\]](#)



TÜRKİYE’DE YARDIMCI ECZACILIK UYGULAMASI: ECZACILARIN PERSPEKTİFİ

ASSISTANT PHARMACIST PRACTICES IN TURKEY: PHARMACISTS’ PERSPECTIVES

Sinan BULUT ¹ , Emrah BİLGİNER ^{2,*} 

¹Çankırı Karatekin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Sağlık Yönetimi Bölümü, Çankırı, Türkiye

²Hitit Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Sağlık Yönetimi Bölümü, Çorum, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada Türkiye’de toplum eczanesi sahibi ve mesul müdürü olan eczacılar ile 2018 yılından itibaren mezun olup kısıtlamalara maruz kalan eczacıların 6308 sayılı kanunda yer alan “Yardımcı Eczacılık Uygulaması” hakkındaki görüşlerini değerlendirmek amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Araştırma 2018 yılından önce mezun olup toplum eczacılığı yapmakta olan ve 2018 yılından sonra mezun olan eczacılara yönelik olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Her iki aşamada araştırmacılar tarafından oluşturulan anket formları kullanılmıştır. Veriler IBM SPSS 21 paket programında analiz edilmiştir. Veriler T testi, Anova ve Post-hoc testleri ile analiz edilmiş ve puanlamalar hesaplanmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Araştırmanın 1. aşamasında 413 toplum eczacısına, 2. aşamasında ise 395 eczacıya ulaşılmıştır. Toplum eczacıları içinde yardımcı eczacılık uygulamasını desteklemeyenlerin oranı %30,8 olarak bulunmuştur. Bu grubun %53,0’ü ise uygulamanın geliştirilmesi gerektiğini belirtmiştir. Araştırmada 2018 yılından sonra mezun olan eczacıların “yürürlükteki yardımcı eczacılık uygulamasından memnunum” ifadesi için katılım düzeyi ortalaması $1,96 \pm 1,19$ (1 kesinlikle katılmıyorum, 5 kesinlikle katılıyorum) şeklinde en düşük ortalama değer olarak bulunmuştur. Araştırmada eczacılık fakültesi sayısının fazlalığı, yetersiz fakültelerin kapatılması, yardımcı eczacılık uygulaması için devlet desteğinin sağlanması ve istihdamın artırılması, araştırmaya katılan her iki grup için de ifade edilen ve katılım derecesi yüksek konular olmuştur. Yardımcı eczacılık uygulamasının sürdürülebilirliği ve verimliliği açısından tüm paydaşların görüşleri doğrultusunda adımların atılmasının uygun olacağı değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Yardımcı eczacılık uygulaması, eczacı, eczacılık işletmeciliği, Türkiye

ABSTRACT

Objective: In this study, it was aimed to evaluate the opinions of pharmacists who are the owners and responsible managers of community pharmacy and pharmacists who graduated after 2018 and were exposed to restrictions on the "Assistant Pharmacy Practices" in the Law No. 6308.

Material and Method: The study was carried out in two stages, for pharmacists who graduated before 2018 and are practicing community pharmacy, and for pharmacists who graduated after 2018. Questionnaire

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Emrah Bilgener
e-posta / e-mail: emrahbilgener@hitit.edu.tr

forms created by the researchers were used in both stages. The data were analyzed in the IBM SPSS 21 package program. Data were analyzed with T test, Anova and Post-hoc tests and scores were calculated.

Result and Discussion: In the first stage of the study, 413 community pharmacists were reached, and in the second stage, 395 pharmacists were reached. The rate of those who do not support the assistant pharmacist practices among community pharmacists was found to be 30.8%. 53.0% of this group stated that the application should be improved. In the study, the mean of the pharmacists who graduated after 2018 for the statement "I am satisfied with the current co-pharmacy practice" was found to be the lowest average value of 1.96 ± 1.19 (1 strongly disagree, 5 strongly agree). The high number of pharmacy faculties, the closure of inadequate faculties, the provision of state support for assistant pharmacist practices and the increase in employment were the subjects with high participation rates for both groups participating in the research. It was considered that it would be appropriate to take steps in line with the opinions of all stakeholders in terms of the sustainability and efficiency of the assistant pharmacist practices.

Keywords: Assistant pharmacist practices, pharmacist, pharmacy management, Turkey

GİRİŞ

Osmanlı Devletinde eczacılık mesleği ile ilgili düzenlemeler ilk defa 1850’li yıllarda yapılmaya başlanmış [1] ve süreç içerisinde birçok değişikliğe uğramıştır [2]. Cumhuriyetin ilanından sonra “İспенçiyari Ve Tıbbi Müstahzarlar Kanunu” (1928/1262) [3] ve “Eczacılar ve Eczaneler Hakkında Kanun” (1953/6197) [4] ile eczacılık mesleğinin ilk kanunları yürürlüğe girmiştir. Son değişiklik ise 2012 yılında 6308 sayılı “Eczacılar ve Eczaneler Hakkında Kanun ile Uyuşturucu Maddelerin Murakabesi Hakkında Kanunda Değişiklik Yapılmasına Dair Kanun” ile yapılmıştır [2]. Bu kanun ile toplum eczanesi açmak ve ya toplum eczanelerinde mesul müdürlük yapmak isteyen eczacılık fakültesi mezunlarına, en az bir yıl süre ile bir mesul müdür eczacı yanında toplum eczanesinde yardımcı eczacılık yapma şartı getirilmiştir. Toplum eczanesinde en az bir yıl ikinci eczacılık yapmış olanlar ve en az bir yıl hastane eczanesinde çalışmış olanlar bu koşulu sağlamış olacaklardır. Kanunun yürürlüğe girdiği 2012 yılında eczacılık fakültelerine yerleşmiş olan ve bu yıl üniversite sınavına girip kazanacak olanlar muaf tutulmuştur [5]. Kanunun 2013 yılı sonrasında eczacılık fakültelerine girecek öğrenciler için bağlayıcılığı bulunmaktadır [2]. Bu değişikliğin temel nedeninin, 2001 yılında 8 olan eczacılık fakültesi sayısının 2012 yılında 17’ye yükselmesi sonucu [6] toplum eczanelerinde yaşanan ekonomik sıkıntılara çözüm bulmak ve eczane sayısının artmasıyla ortaya çıkacak sorunları azaltmak [7] olduğu ifade edilmektedir. Ancak ilerleyen süreçte merkezi otorite meslek örgütlerinden gelen uyarılara rağmen 2020 yılında eczacılık fakültesini 50’ye yükseltmiştir [8]. Sağlık Bakanlığı Sağlıkta İnsan Kaynakları 2023 Vizyonu raporuna göre 2023 yılında eczacı ihtiyacı 32.900 olarak belirlenmiş ise de, 2019 yılında bu sayı 37.791 olarak gerçekleşmiştir [8]. İlgili kanunda yardımcı eczacılara ne kadar maaş verileceği, nüfus kriterleri, meslek puanı gibi konular açıklanmıştır [9]. Ayrıca, 2014 yılında yayınlanan “Eczacılar ve Eczaneler Hakkında Yönetmeliğin” 16. Maddesi ile yıllık satış hasılatı ve reçete sayısı belli bir limitin üzerinde olan toplum eczanelerinin talep olması halinde yardımcı eczacı çalıştırmalarını zorunlu kılmıştır [2].

Son yıllardaki literatür kanıtları, eczacılık hizmetleri performansının sağlık sisteminin başarısında kritik bir faktör olduğunu ve toplumun sağlık sonuçlarında önemli bir gelişme yarattığını göstermiştir [10]. Bu nedenle, bağımsız toplum eczanelerinin halk sağlığı için yaşamlarını devam ettirmeleri gerekmektedir. Hazırlanan yeni kanun ve yönetmelikler her ne kadar bazı haksızlıklara neden oluyor olarak görünse de, aslında hali hazırda hizmet vermeye devam eden toplum eczaneleri koruması ve hizmetin gelecekte aksamaması açısından önem arz etmektedir. Yürürlüğe girdiği tarihten itibaren birçok mesleki ortamda tartışmalara neden olan kanun [2] literatürde bilimsel açıdan sadece bir çalışmada ele alınmıştır [2]. Türkiye’de uygulamaya alınan yardımcı eczacılık uygulamasına benzer düzenlemeler Amerika Birleşik Devletleri [11] ve Avrupa Birliği ülkelerinde de 1-5 yıl arası sürelerde uygulanmaktadır [12].

Çalışma Türkiye’de toplum eczanesi sahibi ve mesul müdürü olan eczacılar ile 2018 yılından itibaren mezun olup kısıtlamalara maruz kalan eczacıların 6308 sayılı kanunda yer alan “Yardımcı Eczacılık Uygulaması” hakkındaki görüşlerini değerlendirmek, gelecekte yapılacak düzenlemelere kaynak oluşturmak ve çözüm önerileri sunmak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma Evreni

Araştırma iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Araştırmaya başlamadan önce Hitit Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulu’na başvurulmuş ve ilgili kurulca çalışma etik açıdan uygun bulunmuştur (Karar No: 2020-93). Birinci aşamada 2018 yılından önce mezun olmuş yardımcı eczacılık uygulaması kapsamı dışında olan ve eczanesi bulunan toplum eczacıları ile çalışılmıştır. Bu aşamada çeşitli sosyal medya kanallarından eczacılara, internet ortamında oluşturulan anket formu gönderilmiştir. Birinci aşamanın evrenini Türkiye’nin 81 ilinde bulunan yaklaşık 26.115 [13] eczane oluşturmaktadır. Bu aşamada eczacılara gönderilen anket formunu 413 eczacı yanıtlamıştır.

Araştırmanın ikinci aşaması ise 2018 yılından sonra mezun olmuş ve yardımcı eczacılık uygulaması kapsamına dâhil olan eczacılar ile yapılmıştır. Araştırmanın bu aşamasında katılımcıların yardımcı eczacılık uygulamasının kapsadığı eczacılar olması nedeniyle daha fazla önem kazanmaktadır. Bu aşamada da ilk aşamada olduğu şekliyle internet ortamında oluşturulan form sosyal medya araçları vasıtasıyla mezun eczacıların bulunduğu sosyal medya gruplarında paylaşılmıştır. 2018-2019 ve 2020 yılı mezunlarının oluşturduğu çalışmanın ikinci aşamasının evrenini yaklaşık 5.350 [13] eczacı oluşturmaktadır. Bu aşamada yanıtlanan anket formlarından 395 yanıt değerlendirmeye alınmıştır. Araştırmanın her iki aşamasında da örneklem seçilmemiştir. Ulaşılabilecek maksimum sayıya ulaşılması hedeflenmiştir. Ancak, araştırmada bir süre sonra anket geri dönüş sayısı giderek azaldığından elde edilen anketler ile çalışma gerçekleştirilmiştir. Araştırmanın verileri 10.11.2020 – 28.03.2021 tarihleri arasında toplanmıştır.

Veri Toplama Aracı

Araştırmanın ilk aşamasında araştırmacılarca hazırlanmış dar kapsamlı bir anket formu kullanılmıştır. Anket formunda sosyo-demografik sorular ile birlikte katılımcıların yardımcı eczacılık uygulamasını destekleyip desteklemedikleri ve geliştirilmesi gereken yönleri konusunda görüşleri sorulmuştur. Elde edilen görüşler araştırmanın ikinci aşamasına dayanak oluşturmuştur.

Araştırmanın ikinci aşamasında da araştırmacılar tarafından hazırlanan daha kapsamlı bir anket formu kullanılmıştır. Anket formu birinci aşamada elde edilen toplum eczacılarının görüşleri (Tablo 1) ve literatür doğrultusunda oluşturulmuştur. Anket formu 6 adet sosyo-demografik ve 32 adet yardımcı eczacılık uygulaması ve eczacılık mesleğine ilişkin olmak üzere toplam 38 sorudan oluşturulmuştur. Anket formunda sosyo-demografik sorular dışında kalan sorularda katılımcılara eczacılık mesleği ile ilişkili çeşitli ifadeler katılım düzeyleri sorulmuştur. Anket formunda yer alan bu ifadeler 5=kesinlikle katılıyorum, 4=katılıyorum, 3=kararsızım, 2=katılmıyorum ve 1=kesinlikle katılmıyorum olacak şekilde 5'li Likert ölçeği ile derecelendirilmiştir. Anket formu, pandeminin oluşturduğu risk nedeniyle, eczacılık fakültelerinden son 3 yıl içinde mezun olmuş eczacıların bulunduğu sosyal medya platformu üzerinden iletilmiş ve 395 eczacı anketi yanıtlayarak araştırmaya katılmıştır.

Verilerin Analizi

Araştırmanın her iki aşamasından elde edilen veriler, IBM SPSS 21 programı ile analiz edilmiştir. Araştırmada elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmelerinde tanımlayıcı istatistikler verilmiştir. Ayrıca eczacılık mesleğine ilişkin ifadeler katılım derecelerine ilişkin ortalamalar arasında farklılıklar da istatistiksel anlamlılık açısından değerlendirilmiştir. İki grubun ortalama değerlerinin istatistiksel anlamlılık testlerinde bağımsız gruplarda T testi, ikiden fazla gruplarda istatistiksel anlamlılık için tek yönlü Varyans Analizi (ANOVA) testi kullanılmıştır. Varyansların homojen olması sebebiyle farkın anlamlı çıktığı gruplarda Tukey testi ile farklılığın kaynaklandığı gruplar belirlenmiştir. $p < 0.05$ istatistiksel anlamlılık olarak değerlendirilmiştir. Araştırmada yer alan açık uçlu soruların yanıtları ise içeriklerine göre belirli ifadeler altında gruplandırılmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Araştırmanın birinci aşamasını toplum eczacılarına uygulanan anket oluşturmaktadır. . Araştırmaya 413 eczacı katılmıştır. Katılımcıların 195'i (%47,2) erkek, 218'i (52,8) ise kadındır. Katılımcıların yaş ortalaması $38,6 \pm 9,53$ olarak bulunmuştur.

Katılımcıların yardımcı eczacılık uygulamasını destekleme durumları değerlendirildiğinde; katılımcıların 127'sinin (%30,8) uygulamayı desteklemediği, 67'sinin (%16,2) desteklediği ve 219'unun (%53,0) ise uygulamanın geliştirilmesi gerektiği konusunda fikrini belirttiği tespit edilmiştir (Tablo 1).

Araştırmada uygulamanın geliştirilmesi gerektiğini belirtenler için geliştirmeye yönelik herhangi bir önerilerinin olup olmadığı da sorulmuş olup, önerilerini yazmaları istenmiştir. Bu kapsamda 230 öneri belirtilmiştir. Bu önerilerden benzer veya aynı hususu belirten öneriler bir arada değerlendirilerek Tablo 1’de sunulmuştur. Öneriler arasında 114 kişi tarafından en çok ifade edilen öneri “Devlet desteği olmalı (meslek hakkı, kârlılık artışı ve SGK iskontosu düşürülmeli)” şeklinde olmuştur. Bu önerinin ardından ikinci sırada 17 kişinin ifadesi ile “Fakülte kontenjanları azaltılmalı ve yetersiz fakülteler kapatılmalı” önerisi yer almıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Toplum eczacılarının yardımcı eczacılık uygulamasını destekleme durumları ve uygulamaya yönelik önerileri

Yardımcı eczacılık uygulamasını destekleme durumu	Sayı	%
Desteklemeyenler	127	30,8
Destekleyenler	67	16,2
Geliştirilmeli	219	53,0
Toplam	413	100,0
Geliştirmeye yönelik öneriler*		
Devlet desteği olmalı (meslek hakkı, kârlılık artışı ve SGK iskontosu düşürülmeli)	114	49,6
Fakülte kontenjanları azaltılmalı ve yetersiz fakülteler kapatılmalı	17	7,4
Zorunlu olmamalı	16	7,0
Yaş sınırı olmalı (65 yaş üstü ve emeklilik)	13	5,7
Fakültede staj şeklinde ve ekstra eğitimler ile yapılmalı	10	4,3
Sadece ciro esas alınmamalı (reçete sayısı, beyan edilen kârlılık)	10	4,3
Tüm tabana yayılmalı ve eczacılık bakım hizmetlerine önem verilmeli, teknikerlik kalkmalı	9	3,9
Maaş dayatması olmamalı, maaş düşürülmeli	9	3,9
TEB ve eczacılık odaları maddi destek vermeli	8	3,5
Süre kısaltılmalı	6	2,6
Devlet eczacı istihdamını artırmalı ve yardımcı eczacıları istihdam etmeli	6	2,6
Özel sektör istihdamı artırılmalı ve zorunlu olmalı (depo, ilaç ve kozmetik üreticisi vb.)	5	2,2
Maaş yükseltilmeli ve denge sağlanmalı	3	1,3
Atama kura ile olmalı	2	0,9
Süresi uzatılmalı, eczacı yardımcı eczacılık yaptığı ilçede eczane açamamalı	2	0,9
Toplam	230	100,0

* Katılımcılar birden fazla öneride bulunabilmişlerdir.

Araştırmanın 2. aşaması 2018-2019 ve 2020 yıllarında mezun olmuş eczacılar ile yapılmıştır. Araştırmada 395 eczacının yanıtları değerlendirilmiştir. Katılımcıların 121’i (%30,6) erkek, 274’ü (%69,4) kadındır. Katılımcı eczacıların yaş ortalaması 25,2±1,91 olarak bulunmuştur. Araştırmaya katılan eczacıların 333’ü (%84,2) bekâr iken, 62’si (%15,7) evlidir.

Araştırmada katılımcılara sosyo-demografik özellikleri dışında yardımcı eczacılık uygulaması ve eczacılık mesleği ile ilgili ifadeler verilerek katılma durumları da değerlendirilmiştir. Değerlendirmede katılımcılardan kesinlikle katılıyorum 5, ... kesinlikle katılmıyorum ise 1 olacak şekilde bir derecelendirme yapılması istenmiştir. Katılımcıların verdikleri yanıtlara göre ifadelerle katılım düzeyleri, tüm katılımcıların esas alınarak belirlenen ortalama değerler üzerinden Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2 değerlendirildiğinde $4,87 \pm 0,48$ ortalama değer ile “kamu ve özel hastanelerde daha fazla eczacı istihdam edilmeli” ifadesi en yüksek katılım düzeyi olarak bulunmuştur. Ayrıca ortalama değerlerde katılım düzeyinin en yüksek olduğu diğer ifadeler ise; eczacılık fakültesi sayısının fazlalığı, yetersiz eczacılık fakültelerinin kapatılması gerektiği ve eczacı istihdamının zorunlu olması gibi ifadeler olmuştur (Tablo 2). Ayrıca tüm yanıtlar düzeyinde katılma açısından en düşük katılım ortalaması “yardımcı eczacılık uygulamasından memnunum” ifadesine olmuştur. Bu ifadeye katılım ortalaması $1,96 \pm 1,19$ olarak bulunmuştur (Tablo 2).

Toplum eczacılarının verdiği cevaplar değerlendirildiğinde uygulamayı destekleyenler ve geliştirilmesini düşünenlerin çoğunlukta olduğu (%68,2) görülmektedir (Tablo 1). Toplum eczacılarının uygulamayı büyük bir oranda destekliyor olmaları, son yıllarda yaşanan ekonomik sıkıntılar [14] nedeniyle kendi işletmelerini muhafaza edebilmek için bu görüşe hâkim olduklarını düşündürmektedir. Diğer taraftan büyük oranda gerçekleşen bu desteğin anlamlı olabilmesi için gelecekte istihdam yönünde yansımaları olmalıdır. Çünkü uygulama geliştirilmeli ifadesini kullanan toplum eczacılarının görüşlerinin %49,3’ü devlet desteği (meslek hakkı, kârlılık artışı ve SGK iskontosu düşürülmeli) olmalı şeklinde olmuştur (Tablo 1). Bu desteğin sağlanması durumunda gelecekteki yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacıların toplum eczanelerinde istihdam edilme şanslarını artıracaktır. Yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacıların da bu hususa yönelik katılım düzeylerinin yüksek (4,73) olduğu görülmektedir (Tablo 2). Ancak, önerilerin devlet desteği olmalı fikrinde yoğunlaşması toplum eczacılarının sorumluluktan kaçma yönünde subjektif bir yaklaşımı olarak da değerlendirilebilir. Toplum eczacıları bu süreçte sorumluluk almalı ve mesleğin geleceğini kararlı adımlarla inşa etmelidir. Düzenlemeler ve mesleğin dönüşümü merkezi otoritenin kararına bırakılmamalıdır. Toplum eczacılarının görüşlerinin %7,4’ü eczacılık fakültelerinin sayısının ve kontenjanlarının azaltılması olmuştur. Bu oranın düşük olması toplum eczacılarının ülke siyasal yaşamına dair edindikleri tecrübe ile açıklanabilir. Toplum eczacıları içinde uzak görüşlülük sahibi olduğu düşünülen, mesleğin dönüştüğü algısına sahip ve gelecekte yaşanacak mesleki sorunların farkında olan katılımcılar uygulamanın tüm tabana yayılarak eczacılık bakım hizmetlerine önem verilmesi ve teknikerlik yerine eczanelerde daha çok eczacı istihdam edilmesi hakkında fikir beyan etmiştir (%3,9).

Hastalar tedavileri ile ilgili toplum eczacıları ile daha çok iletişim içinde bulunmaktadır [15]. Eczanelerde birden fazla eczacı bulunması durumunda bu iletişim kanallarının daha açık olacağı düşünülmektedir. Böylece eczacılık hizmetleri kalitesi ve aynı zamanda tedavinin başarısı artıracaktır. Eczacıların öncelikli hedefi hastaları ile iyi bir iletişim geliştirerek, tedavinin en doğru şekilde uygulanmasını sağlamaktır [16].

Öte yandan, kamu ve özel hastanelerde daha çok eczacı istihdam edilmesi gerekliliği giderek artmaktadır. Bu kapsamda hastane eczacıları ile yapılan bir çalışmada eczacılar çalışma saatleri ve iş yükü nedeniyle işlerinin yorucu olduğunu belirtmişlerdir [17]. Yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan

eczacılar yüksek oranda (4,87) bu yönde fikir beyan etmişlerdir (Tablo 2). Hastanelerdeki eczacı istihdamına yönelik yapılan bir araştırmada, 2019 yılında kamu hastanelerinde 2673, üniversite hastanelerinde 573, özel hastanelerde 572 ve belediye hastanelerinde ise 3eczacı istihdam edildiği belirtilmiştir. Ortalama eczacı istihdamı kamu hastanelerinde 3,9 üniversite hastanelerinde 12,4 ve özel hastanelerde 1 olarak gerçekleşmiştir [13]. Eczacılık hizmetlerinin yataklı kurumlarda kaliteli ve bilimsel olarak verilebilmesi için eczacı istihdamı her 50 yatak için 1 olacak şekilde düzenlenmelidir. Kozmetik ve gıda üreten tesislerde de eczacı istihdamı zorunlu hale getirilmelidir.

Tablo 2. Yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacıların ifadelerine katılım düzeyleri

İfadeler	Ort±SS
Kamu ve özel hastanelerde daha fazla sayıda eczacı istihdam edilmelidir.	4,87±0,48
Türkiye’de eczacılık fakültesi sayısı fazladır.	4,83±0,59
Yetersiz eczacılık fakülteleri kapatılmalıdır.	4,82±0,60
İlaç fabrikaları ve kozmetik üreticilerinde belirli sayıda eczacı istihdamı zorunlu olmalıdır.	4,81±0,55
Yardımcı eczacı istihdam eden toplum eczanelerine devlet desteği verilmelidir.	4,73±0,65
Yardımcı eczacılık uygulaması tüm taraflar için yeniden düzenlenmelidir.	4,66±0,75
Gelecekte kendi eczanemi açmak gibi bir hedefim var.	4,37±0,99
Türkiye’de eczacı istihdam alanları kısıtlıdır.	4,35±1,05
Eczane sahipleri tarafından yardımcı eczacılara yönelik olumsuz tavır sergilenmektedir.	4,30±1,12
Yardımcı eczacılık uygulaması bana eczacılık mesleğinin fiilen yapılması bakımından önemli tecrübeler sunar.	4,30±1,12
Yardımcı eczacı istihdamı için ciro yanında yaş sınırı ve emeklilik şartları getirilmelidir	4,25±1,24
Daha iyi bir iş bulmam durumunda yardımcı eczacılık yaptığım eczaneden hemen ayrılırdım.	4,07±1,14
Yardımcı eczacılık istihdamı için ciro sınırı düşürülmeli ve yaygın hale getirilmelidir.	3,99±1,31
Yardımcı ve ikinci eczacılık ücretleri artırılmalıdır.	3,98±1,20
Yardımcı eczacılık yapacak eczane bulmakta sorun yaşıyorum.	3,96±1,31
Eczacılık eğitimi süresince yapılan stajların içerikleri değiştirilebilir.	3,96±1,15
Toplum eczanelerinde yardımcı eczacı istihdam edildiği zaman daha kaliteli eczacılık hizmeti verilir.	3,91±1,22
Yardımcı eczacılık kaldırılmayacaksa süresi kısaltılmalıdır.	3,90±1,32
Nüfus sınırlaması kaldırılmalı veya azaltılmalıdır.	3,87±1,38
Yardımcı eczacılık uygulaması kaldırılmalıdır.	3,83±1,27
Eğitimim süresinde yaptığım stajların yeterli olduğunu düşünüyorum.	3,70±1,26
Kanunun değişmeyeceğini düşünürsek, toplum eczanelerinde eczacı teknisyeni yerine eczacılar istihdam edilmelidir.	3,53±1,44
Eczacılık fakültesini tercih ederken eczacılık mesleği ve istihdamı hakkında bilgi sahibiydim.	3,49±1,32
Eczacılık mesleğini tercih ederken değişen eczacılık kanunu hakkında bilgi sahibiydim.	3,45±1,43
Tüm toplum eczanelerine belirli bir süre içerisinde yardımcı eczacı çalıştırma zorunluluğu getirilmelidir.	3,45±1,43
Şartlar uygun olursa yardımcı eczacılık yaptığım eczanede uzun yıllar çalışmak isterim.	3,06±1,47
Eczacılık eğitimi aldığım için pişmanım.	2,78±1,49
Gelecekte özel veya kamuda istihdam edilmezsem eczacılık hizmeti veren zincir marketlerde çalışabilirim.	2,67±1,58
Nüfus sınırlaması artırılmalıdır.	2,34±1,42
Kanun değişiminden önce mezun olarak eczane sahibi olsaydım, eczanemde yardımcı eczacı çalıştırmayı düşünmezdim.	2,24±1,34
Yeni mezunların istihdamı için ikinci eczacılık kaldırılarak yardımcı eczacılık uygulaması tabana yayılarak genişletilmelidir.	2,24±1,34
Yürürlükteki yardımcı eczacılık uygulamasından memnunum.	1,96±1,19

Yetersiz fakültelerin kapatılması düşüncesi Türkiye gerçekleri ile örtüşmemektedir. Ancak gelecekte yeni fakültelerin açılmaması için gerekli çalışmalar paydaşlar ile yapılacak faaliyetlerle kararlaştırılmalı ve hali hazırda belirlenmiş kontenjanlar düzenlenmelidir. Ancak, son yıllarda açılan bu fakültelerin, mezunları tarafından yetersiz görülmesi Türkiye'deki eczacılık eğitiminin kalitesi açısından düşündürücüdür. Yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacılar fakülte sayısının çok olması ve yetersiz olanların kapatılması ifadesine yüksek oranda katılmıştır (Tablo 2).

Yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacıların yardımcı eczacılık sürecinde toplum eczacılarından olumsuz tavırlar gördüklerini belirtmişlerdir (4,30) (Tablo 2). Diğer taraftan ise yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacılar daha iyi bir iş bulma durumunda yardımcı eczacılık yaptıkları eczaneden hemen ayrılırlar ifadesine yüksek bir düzeyde katılmışlardır (4,07) (Tablo 2). Bu iki durum hem toplum eczacıları hem de yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacılar için deontolojik açıdan düşündürücüdür. Yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacılar yardımcı eczacılık sürecinin kendilerine mesleki açıdan tecrübe kazandırdığının farkındadırlar (Tablo 2). Bu farkındalık uygulamanın gerekliliği hakkında bir ipucudur. Literatürde yer alan diğer çalışmada da aynı fikir eczacılık fakültesi son sınıf öğrencileri tarafından belirtilmiştir [2]. Doğal olarak yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacılar uygulamadan memnun olmadıklarını belirtmişlerdir. Ayrıca nüfus kriterinin ve yardımcı eczacılık uygulamasının kaldırılması hakkında fikir belirtmişlerdir. Eczacılık mesleği açısından umut verici bir durum ise yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacılar eczacılık eğitimi aldıkları için pişman olmadıklarını ve zincir eczanelerde istihdam edilmelerine katılmadıklarını belirtmişlerdir (Tablo 2). Ancak yapılan bir çalışmada 2044 yılı için eczacı ve eczane sayılarının simülasyonunda 84.736 eczacıya karşılık 32.572 eczane var olacağı tespit edilmiştir [13]. Bu nedenle gelecekte eczacılık mesleğinin ulaşılabilir ve kaliteli bir şekilde toplum eczanelerinde verilebilmesi için önlemler alınmalı ve istihdam olanakları sağlanmalıdır. Çünkü çalışma durumlarına göre çalışmayan, kamu ve özel sektörde çalışan yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacılar gelecekte eczacılık hizmeti veren zincir markette çalışırım ifadesine kararsız yakın bir derecede kalmaları (Tablo 4) işsiz eczacı sayısının artmasına bağlı olarak değişebilir. Yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacılar yardımcı eczacılık yapacak eczane bulmakta sorun yaşadıklarını belirtmişlerdir (Tablo2). Eczacılık fakültesi son sınıf öğrencileri de bu sorunu yaşamaktadırlar [2].

Araştırmada ayrıca katılımcı yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacılar, yardımcı eczacılık yapmış/yapıyor ve yapmamış olarak iki gruba ayrılmıştır. Bu gruplama doğrultusunda yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacıların ifadelerine katılım düzeyleri incelenmiş ve katılım düzeyi ortalamaları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık olup olmadığı analiz edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, katılımcıların kendi eczanesini açma isteği, istihdam sorununda zincir marketlerde çalışma durumu, nüfus sınırlamasının kaldırılması veya azaltılması ve ciro sınırının

düşürülmesine ilişkin ifadelerinde ortalamalar arasındaki farklar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 3).

Tablo 3. Yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacıların yardımcı eczacılık yapma/yapmama durumuna göre ifadelere katılım düzeyleri

İfade	Yapmış/Yapıyor (n=275)	Yapmamış (n=120)	t	p
Gelecekte kendi eczanemi açmak gibi bir hedefim var.	4,50±0,86	4,08±1,20	-3,911	0,000
Gelecekte özel veya kamuda istihdam edilmezsem eczacılık hizmeti veren zincir marketlerde çalışabilirim.	2,48±1,56	3,10±1,50	3,642	0,000
Nüfus sınırlaması kaldırılmalı veya azaltılmalıdır.	3,76±1,45	4,12±1,16	2,375	0,018
Şartlar uygun olursa yardımcı eczacılık yaptığım eczanede uzun yıllar çalışmak isterim.	2,93±1,45	3,37±1,48	2,719	0,007
Yardımcı eczacılık istihdamı için ciro sınırı düşürülmeli ve yaygın hale getirilmelidir.	3,89±1,36	4,23±1,14	2,319	0,021

Yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacıların yardımcı eczacılık yapmış/yapıyor olmaları bir toplum eczanesinin işleyişini ve serbest eczacılık sektörünü yakından tecrübe etmelerine olanak sağlamaktadır. Yardımcı eczacılık yapmış/yapıyor olan eczacılar geleceğe ümitle bakmakta ve mesleki bağlılıkları artmış görünmektedir. Kendi eczanelerini açmak düşüncesine daha yüksek düzeyde cevap vermişlerdir. Ayrıca eczacılık hizmeti veren zincir marketlerde çalışmaya katılım düzeyleri düşük olmuştur. Ancak yardımcı eczacılık yapmamış olan eczacılar zincir marketlerde çalışma konusunda kararsız ve düşük düzeyde ifadeler belirtmişlerdir. Bunun nedeninin yardımcı eczacılık yapamamaları nedeniyle geleceğe dair kaygılarının olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle diğer üç ifade için de yapmış/yapıyor olan katılımcılardan daha yüksek düzeyde katılımları olmuştur.

Araştırmada katılımcı yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacılar çalışma durumlarına göre de gruplandırılmıştır. Bu grup eczacılar, herhangi bir işte çalışmayanlar, kamuda çalışanlar, kendi eczanesinde çalışanlar, özel sektörde (ilaç deposu, ilaç firması vb.) çalışanlar ve yardımcı eczacılık yapanlar şeklinde gruplandırılmışlardır. Bu doğrultuda çalışma durumuna göre ifadelere katılım düzeyleri ortalamaları elde edilmiştir (Tablo 4).

Gruplar arası ortalama farklılıklarının istatistiksel açıdan anlamlılığı test edilmiştir. Test istatistiği sonuçlarına göre 12 ifadede gruplar arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuş, varyansların homojen olması nedeniyle Post-hoc Tukey testleri ile bu farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığı ortaya konmuştur ($p<0,05$), (Tablo 4).

Yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacılar çalışma durumlarına göre gruplandırıldığında, en dikkat çekici durum kendi eczanelerinde çalışan katılımcıların artık gelecek kaygısı duymama nedeniyle diğer gruplardaki katılımcılardan istatistiksel olarak çok farklı cevap vermiş

Tablo 4. Yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacıların çalışma gruplarına göre ifadelere katılım düzeyleri

İfadeler	(1) Çalışmayan (n=72)	(2) Kamu (n=36)	(3) Kendi eczanesi (n=71)	(4) Özel sektör (n=12)	(5) Yrd. Eczacı (n=204)	Test istatistiği		Farklılığı oluşturan gruplar
						f	p	
Daha iyi bir iş bulmam durumunda yardımcı eczacılık yaptığım eczaneden hemen ayrılıyorum.	4,06±1,14	4,47±0,87	3,73±1,25	4,00±1,20	4,12±1,13	2,804	0,026	2-3
Eczane sahipleri tarafından yardımcı eczacılara yönelik olumsuz tavır sergilenmektedir.	4,37±1,16	4,55±0,73	3,85±1,29	4,50±1,16	4,37±1,07	3,655	0,006	1-3, 2-3, 3-5
Eğitimim süresinde yaptığım stajların yeterli olduğunu düşünüyorum.	3,43±1,29	3,88±1,14	3,35±1,39	4,33±0,98	3,84±1,21	3,896	0,004	3-5
Gelecekte özel veya kamuda istihdam edilmezsem eczacılık hizmeti veren zincir marketlerde çalışabilirim.	3,06±1,46	3,02±1,61	2,21±1,56	3,50±1,44	2,57±1,57	4,263	0,002	1-3
Nüfus sınırlaması artırılmalıdır.	2,26±1,34	2,22±1,37	3,16±1,40	2,58±1,62	2,09±1,36	8,277	0,000	1-3, 2-3, 3-5
Nüfus sınırlaması kaldırılmalı veya azaltılmalıdır.	4,06±1,19	4,22±1,04	2,74±1,57	4,08±1,37	4,11±1,23	16,642	0,000	1-3, 2-3, 3-4, 3-5
Tüm toplum eczanelerine belirli bir süre içerisinde yardımcı eczacı çalıştırma zorunluluğu getirilmelidir.	3,66±1,32	3,55±1,50	2,74±1,60	3,83±1,33	3,62±1,37	5,813	0,000	1-3, 2-3, 3-5
Yardımcı eczacılık istihdamı için ciro sınırı düşürülmeli ve yaygın hale getirilmelidir.	4,31±1,07	4,05±1,24	2,97±1,51	4,16±1,33	4,21±1,15	15,423	0,000	1-3, 2-3, 3-4, 3-5
Yardımcı eczacılık kaldırılmayacaksa süresi kısaltılmalıdır.	3,75±1,48	4,27±1,05	3,05±1,45	3,91±1,31	4,18±1,12	11,556	0,000	1-3, 2-3, 3-5
Yardımcı eczacılık uygulaması bana eczacılık mesleğinin fiilen yapılması bakımından önemli tecrübeler sunar.	3,55±1,36	3,33±1,35	4,14±1,17	3,75±1,28	3,57±1,34	3,655	0,006	1-3, 2-3, 3-5
Yardımcı eczacılık uygulaması kaldırılmalıdır.	3,80±1,21	4,30±1,19	3,15±1,47	4,00±1,34	3,97±1,15	7,734	0,000	1-3, 2-3, 3-5
Yardımcı ve ikinci eczacılık ücretleri artırılmalıdır.	3,98±1,18	4,13±1,19	3,08±1,28	3,58±1,37	4,29±1,01	15,696	0,000	1-3, 2-3, 3-5

olmalarıdır. Kendi eczanesinde çalışan yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacılar eczacılık hizmeti veren zincir marketlerde çalışma ifadesine çalışmayan katılımcılardan daha düşük düzeyde katılmışlardır. Kendi eczanesi olan katılımcılar nüfus sınırlamasının artırılmasında kararsız kalırken bu nüfus sınırlamasının azaltılması veya kaldırılmasına katılmayarak düşük düzeyde cevap vermişlerdir. Yardımcı eczacılığın yaygınlaşması, ciro sınırının düşürülmesi, sürenin kısaltılması, uygulamanın kaldırılması ve ücret artırımı önermelerinde de yine kendi eczanesi olan yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacıların diğer gruplara göre katılım düzeyleri farklı olmuştur. Bu durum bu grup eczacıların kendi eczanelerine sahip olmaları durumunda ifadelere katılım düzeylerinin değişebildiğini göstermektedir.

Araştırmada elde edilen verilere göre;

- Toplum eczacılarının büyük bir kısmı (%68,2) “Yardımcı Eczacılık Uygulamasını” desteklemekte ve geliştirilmesi gerektiğini düşünmektedirler.
- Yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacılar “Yardımcı Eczacılık” yapacak toplum eczanesi bulmakta sorun yaşamaktadır.
- Yardımcı eczacılık yapmak zorunda olan eczacılar uygulamayı desteklemezken, bu düşüncelerinin kendi eczanelerine sahip olduklarında değişebileceği değerlendirilmiştir.
- Yardımcı Eczacılık Uygulamasının sürekliliği ve istihdamın artırılabilmesi için devlet desteği gereklidir.
- Uygulamanın eczacılık hizmetleri sunumunda kaliteyi artıracığı ifade edilmektedir.
- Fakülte ve mezun sayısının her geçen gün arttığı göz önünde bulundurulduğunda, istihdama yönelik sorunlar ile karşılaşılması için kamu ve özel hastanelerde eczacı istihdamı artırılmalıdır.

Sonuç olarak Yardımcı Eczacılık uygulaması Türkiye eczacıları için artık mesleki hayatın bir parçasıdır. Ancak gelecekte bağımsız Toplum Eczaneleri ile eczacılık hizmetinin verilebiliyor olması ve uygulamanın devamlılığı için bazı düzenlemelerin yapılması gerekmektedir. Emeklilik, yaş sınırı, teknikerler yerine eczacı istihdamı, nüfus sınırlamasının süreç içerisinde artırılması, yeterlilik sınavı gibi yeni kriterler akademinin ve diğer paydaşların görüşü alınarak uygulamaya konulmalıdır.

YAZARLARIN KATKISI

Kavram: *S.B., E.B.*; Tasarım: *E.B.*; Denetim: *S.B., E.B.*; Kaynaklar: *S.B., E.B.*; Veri Toplama ve/veya İşleme: *S.B., E.B.*; Analiz ve/veya Yorumlama: *S.B., E.B.*; Literatür Taraması: *S.B., E.B.*; Makalenin Yazılması: *S.B., E.B.*; Kritik İnceleme: *S.B., E.B.*

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

ETİK KURUL ONAYI

Hitit Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 05.11.2021 tarihinde 2020-93 karar numarası ile araştırma için gerekli etik onay alınmıştır.

KAYNAKLAR

1. Karayaman, M. (2008). Türkiye'de eczane sayılarının sınırlandırılmasına ilişkin düzenlemeler ve sonuçları. *Osmanlı Bilimi Araştırmaları*, 10(1): 115 – 135.
2. Arslan, M., Tarhan, N., Şar, S. (2020). Yardımcı eczacılık uygulamasının eczacılık fakültesi öğrencileri perspektifinden GZFT analizi ile değerlendirilmesi: Odak grup çalışması. *Lokman Hekim Dergisi*, 10 (1): 70 – 76. [CrossRef]
3. Mevzuat Bilgi Sistemi Web Site. (1928). Retrieved April 4, 2021, from <https://www.mevzuat.gov.tr/MevzuatMetin/1.3.1262.pdf>. Erişim tarihi: 08.04.2021.
4. İstanbul Sağlık Müdürlüğü Web Site. (1956). Retrieved April 4, 2021, from <http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/sb/ecz/mevzuat/mevzuatPdf/6197kanun.pdf>. Erişim tarihi: 08.04.2021.
5. T.C. Resmi Gazete (2012). Eczacılar ve Eczaneler Hakkında Kanun ile Uyuşturucu Maddelerin Murakabesi Hakkında Kanunda Değişiklik Yapılmasına Dair Kanun., Kanun no: 6308. 17 Mayıs 2012. Sayı: 28309. Başbakanlık Basımevi. Ankara
6. İlaç Haber Aktüel Web Site. (2020). Retrieved April 8, 2021, from <http://www.ilachaberaktuel.com/fakulte-sayisi-artiyor-istihdam-yerinde-sayiyor/>. Erişim tarihi: 08.04.2021.
7. Ankara Eczacı Odası Web Site. (2018). Retrieved April 8, 2021, from <http://www.aeo.org.tr/DuyuruModulu/Duyurular/Details/41258?AspxAutoDetectCookieSupport=1>. Erişim tarihi: 08.04.2021.
8. Türk Eczacıları Birliği Web Site. (2019). Retrieved April 8, 2021, from <https://www.teb.org.tr/news/8401/50-OLDU-ECZACILIK-MESLE%C4%9E%C4%B0-%C4%B0C3%87%C4%B0N-TEHL%C4%B0KE-%C3%87ANLARI-%C3%87ALİYOR>. Erişim tarihi: 08.04.2021.
9. Resmi Gazete Web Site. (2012). Retrieved April 8, 2021, from <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2012/05/20120531-3.htm>. Erişim tarihi: 08.04.2021.
10. Vermeulen, L.C., Rough, S.S., Thielke, T.S., Shane, R.R., Ivey, M.F., Woodward, B.W., Pierpaoli, P.G., Thomley, S.M., Borr, C.A., Zilz, D.A. (2007). Strategic approach for improving

- the medication-use process in health systems: the high-performance pharmacy practice framework. *American Journal of Health System Pharmacists*, 64, 1699 – 1710. [\[CrossRef\]](#)
11. Massachusetts Collage of Pharmacy and Health Sciences (MCPHS) (2020-2021). University Course Catalog. Sayfa 299-305.
 12. World Health Organization. (2019). The legal and regulatory framework for community pharmacies in the WHO European Region. p:18-19.
 13. Çalığışu, M., Özçelikay, G. (2020). Türkiye’de eczacılık mesleğinin gelecek işgücü kapasitesinin analizi. In G. Özçelikay and İ. Yıldız (Eds.), *Eczacılıkta Yenilikler-3* (pp. 145 - 156). Ankara Üniversitesi Basımevi. ISBN:978-605-136-491-9.
 14. Bilgener, E., Ünal, A. (2019). Eczacılık hizmetlerinden memnuniyetin belirlenmesi Çorum ili örneği. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 43(3), 259 – 273. [\[CrossRef\]](#)
 15. Adepu, R., Nagavi, B.G. (2006). General practitioners’ perceptions about the ex-tended roles of the community pharmacists in the State of Karnataka: A study. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*; 68: 36 – 40. [\[CrossRef\]](#)
 16. Van Wijk, B.L.G., Klungel, O.H., Heerdink, E.R., de Boer, A. (2005). Effectiveness of interventions by community pharmacists to improve patient adherence to chronic medication: A systematic review. *Annals Pharmacotherapy*, 39, 319 – 328. [\[CrossRef\]](#)
 17. Karaca, G., Kıran, B. (2016). Occupational problems of public hospital pharmacists. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 20(2): 191 – 198. [\[CrossRef\]](#)



SYNTHESIS, ANTIMICROBIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF YLIDENHYDRAZIDES OF 2-((4-R-5-R₁-4H-1,2,4-TRIAZOL-3- YL)THIO)ACETALDEHYDES

2-((4-R-5-R₁-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-İL)TİYO)ASETALDEHİTLERİN

İLİDENHİDRAZİDLERİNİN SENTEZİ, ANTİMİKROBİYAL VE ANTİFUNGAL AKTİVİTESİ

Roman SHCHERBYNA^{1,*} , Olexandr PANASENKO¹ , Olha POLONETS² ,

Natalia NEDOREZANIUK² , Maryna DUCHENKO² 

¹Zaporizhzhya State Medical University, Faculty of Pharmacy, Department of Natural Sciences for Foreign Students and Toxicological Chemistry, 69000, Zaporizhzhya, Ukraine

²National Pirogov Memorial Medical University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, 21018, Vinnytsya, Ukraine

ABSTRACT

Objective: The aim of this work is the synthesis and studying of antimicrobial and antifungal properties of the ylidenhydrazides of 2-((4-R-5-R₁-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetaldehydes with the establishment of structure-activity relationships of the synthesized compounds.

Material and Method: Determination of antimicrobial and antifungal activity was performed by disc-diffusion method (DDM) on series of gram positive and gram negative bacteria such as *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida*.

Result and Discussion: A new series of ylidenhydrazides of 2-((4-R-5-R₁-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetaldehydes were synthesized and their structures were confirmed by modern methods of instrumental analysis: IR and ¹H-spectroscopy, elemental analysis and GS\MS method. For 13 compounds, the antimicrobial and antifungal activities were studied on 10 strains of microorganisms in 3 different concentrations (0.1; 0.2; 0.5%). According to the results of the study, some regularities of the structure-activity relationship have been established. The obtained results can serve as a basis for the targeted search compounds with pronounced antibacterial action. An increasing the concentration of tested compounds predictably lead to increase on antimicrobial activity in almost all cases. The most active compound in our study is N'-(2-((5-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)ethylidene)-4-nitrobenzohydrazide **3i** (ZOI for *Sta.s.* and *Sp* in 0.5% concentration is 25 and 26 mm, respectively).

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

Keywords: Antimicrobial activity, synthesis, 1,2,4-triazole

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, 2-(4-R-5-R₁-4H-1,2,4-triazol-3-yl)tio)asetaldehitlerin bir dizi ilidenhidrazidinin sentezi ve antimikrobiyal ve antifungal özelliklerinin yapı-etki ilişkisi kurularak incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem: Antimikrobiyal ve antifungal aktivitenin tespiti, aşağıdaki mikroorganizma türleri için disk-difüzyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir: *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida*.

Sonuç ve Tartışma: Yeni 2-((4-R-5-R₁-4H-1,2,4-triazol-3-yl)tio)asetaldehitlerin ilidenhidrazidleri sentezlenmiştir. Yapıları modern analiz yöntemleri olan IR, ¹H spektroskopisi, element analizi ve GS\MS yöntemi ile doğrulanmıştır. Sentezlenen 13 bileşik için antimikrobiyal aktivite, 3 farklı konsantrasyonda (0.1; 0.2; % 0.5) 10 mikroorganizma suşu üzerinde çalışılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, bazı yapı-etki ilişkileri kurulmuştur. Elde edilen sonuçlar, belirgin antibakteriyel etkiye sahip bileşikler için hedeflenen araştırmanın temelini oluşturabilir. Test maddelerinin konsantrasyonunun artırılmasının, neredeyse tüm durumlarda antimikrobiyal etkiyi artıracığı tahmin edilmektedir. Çalışmamızdaki en aktif bileşik N'-(2-((5-metil-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)etiliden)-4-nitrobenzohidrazid 3i'dir (ZOI Sta.s. ve Sp. - 25 ve 26 mm % 0,5 konsantrasyonda).

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, sentez, 1,2,4-triazol

INTRODUCTION

From ancient times humanity deals with the enormous amount of diseases [1]. From the report of World Health Organization (WHO) lethal cases, which are caused by pathogenic microorganisms occupy one of the leading places [2]. This problem is especially acute in countries, where economic opportunities do not allow to keep the flashes of infectious diseases under full control. Therefore, the need for new, affordable, and highly active bactericidal drugs is appropriate and justified [2].

This issue was partially solved by the drugs discovery, which capable of destroying pathogenic microflora (antibiotics). This discovery made a real revolution in medicine, and the creation of new drugs provided to doctors the opportunity, in almost 100 percent of cases, to successfully overcome any infectious disease. However, the important fact remains that most popular antibiotics are constantly losing their effectiveness. The reason is - antibiotic resistance of bacteria (ARB) [3]. Improper, irrational, and uncontrolled use of antimicrobial drugs leads to the formation of favorable conditions for the emergence, spread and storage of resistant microorganisms [3]. Balanced and appropriate use of antibiotics usually reduces the risk of ARB, but does not rule out the need to replace obsolete drugs with new, more effective and less toxic. In this aspect, nitrogen-containing systems are very promising class of compounds [4-7]. Triazole derivatives have long been included in world medical practice as highly active antibacterial, neuroleptic, antihypertensive and antispasmodic drugs [8, 9]. Derivatives of 1,2,4-triazole deserve special attention in this issue [10, 11]. A perfect example is posaconazole, voriconazole, itraconazole, which have already established themselves as quite effective antifungal agents [12]. Therefore, given the above information which based on previously obtained results, shows us the priority of drugs design among thio derivatives of 1,2,4-triazole.

MATERIAL AND METHOD

Equipment

The melting points of synthesized compounds were established by the open capillary method on the OptiMelt MPA100 device with platinum RTD sensor (the range of temperature measurements is 30-400°C with 1°C resolution). The elemental analysis was provided by the analyzer Elementar Vario L cube for Carbon, Hydrogen, Nitrogen and Sulfur (II) with standard - 4-aminobenzenesulfonamide.

The ¹H NMR spectra (400 MHz) were obtained from Varian MR-400 spectrometer (DMSO-d₆ as a solvent) analyzed by ADVASP Analyzer program. IR-spectra (4000-400 cm⁻¹) were taken off on the module of ALPHA-T (KBr) of spectrometer of Bruker ALPHA FT-IR. The individuality and purity of the targeting compounds were established by the gas chromatograph system Agilent 7890B with a 5977B mass spectrometry detector. The column is DB-5ms 30 m x 250 μm x 0.25 μm with length.

Chemical part

The initial compounds 2-((4R-5R1-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetaldehydes 2a-c were synthesized at the Department Of Natural Sciences For Foreign Students And Toxicological Chemistry of the Zaporizhzhya State Medical University (Ukraine) and purified by recrystallization with content of the main component ≥ 98%. All chemicals were obtained from UKRORGSYNTEZ Ltd (Kyiv, Ukraine) with documental approving of its purity and quality.

Biological Part

The determination of antimicrobial and antifungal activities was conducted by disc-diffusion method (DDM) on different strains of microorganisms: *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* ATCC 10700, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* spp. ATCC 35664, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Candida* (Table 1). The studies were performed according to the current instructions for medical use of discs with antibiotics to determine the sensitivity of microorganisms to drugs [13-16]. Standard disks, previously sterilized and impregnated with solutions of test substances (in DMSO), were used for the experiment. Mueller-Hinton nutrient agar was used to determine sensitivity. The agar was poured into 15 ml sterile Petri dishes with a diameter of 100 mm, located on a horizontal surface. Before infection, the surface of the solidified agar was dried for 30-40 minutes.

The inoculum was prepared from pure 18-20-hour cultures of bacteria grown on the surface of a dense nutrient medium. Next, 5-10 isolated colonies were suspended in a liquid nutrient medium or in isotonic sodium chloride solution. The suspension or broth culture was diluted with isotonic sodium chloride solution to a turbidity of the optical standard by 10 units, and then the resulting mixture was diluted again 20 times.

Table 1. Antibacterial and antifungal activity ylidenedhydrazides of 2-((4-R-5-R₁-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetaldehydes (**3a-3m**)

Zone of inhibition around the disks, mm	Compound		3a	3b	3c	3d	3e	3f	3g	3h	3i	3j	3k	3l	3m	Tobr ^y	Nyst ^y
	Strains	Concentration															
	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> ATCC 10700 ^x	0.1 %	- ^z	14	-	-	-	-	-	-	12	-	-	5	-	23	-
		0.2 %	-	19	-	5	-	-	-	-	15	-	-	7	-		
		0.5 %	7	24	-	9	7	-	-	-	18	-	6	12	-		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 ^x	0.1 %	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26	-
		0.2 %	15	-	7	-	9	-	5	-	8	-	-	7	-		
		0.5 %	19	-	16	5	14	9	13	-	11	-	-	10	-		
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 ^x	0.1 %	5	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	19	-
		0.2 %	7	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-		
		0.5 %	10	-	-	-	-	-	8	-	10	-	-	-	-		
	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315 ^x	0.1 %	9	-	-	-	-	-	-	-	5	-	6	-	-	14	-
		0.2 %	17	-	-	-	-	-	-	-	8	-	8	-	-		
		0.5 %	23	-	-	-	-	-	-	-	13	-	9	-	-		
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 ^x	0.1 %	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-	25	-
		0.2 %	-	-	-	-	5	-	-	17	6	-	-	-	-		
		0.5 %	12	-	9	-	8	-	-	26	9	-	6	-	5		
	<i>Salmonella spp.</i> ATCC 35664 ^x	0.1 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	-
		0.2 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		0.5 %	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305 ^x	0.1 %	9	12	-	7	-	-	-	-	12	-	-	5	-	21	-
		0.2 %	13	16	8	11	10	-	10	7	17	10	-	9	-		
		0.5 %	19	19	13	14	11	-	15	9	25	14	-	13	7		
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 ^x	0.1 %	5	10	-	7	-	-	-	-	7	-	-	-	-	29	-
		0.2 %	10	16	-	12	-	-	-	-	10	-	-	-	-		
		0.5 %	13	18	7	16	-	-	5	-	10	8	-	5	-		
	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615 ^x	0.1 %	-	9	-	-	5	-	7	-	10	-	-	-	-	20	-
		0.2 %	9	16	9	6	8	-	10	-	19	-	-	-	-		
		0.5 %	20	22	14	12	8	-	13	-	26	6	-	-	9		
	<i>Candida albicans</i> ATCC 2091 ^x	0.1 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	-	-	-	-	29
		0.2 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		0.5 %	9	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

^x C.p. - *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* ATCC 10700, P.a. - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, E.f. - *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, P.v. - *Proteus vulgaris* ATCC 13315, E.c. - *Escherichia coli* ATCC 25922, Sal.s. - *Salmonella* spp. ATCC 35664, Sta.s. - *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305, S.a. - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, S.p. - *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, C. - *Candida albicans* ATCC 2091.

^z - means «not active»

^y Tobramycin disks 10 µg

^y Nystatin NS 100 Units

The inoculum, with a total volume of 1 ml, was applied to the surface of the agar medium and evenly distributed by shaking it. The remaining liquid was removed with a pipette. Semi-open Petri dishes were dried at room temperature for 10-15 minutes.

The discs were placed with tweezers on the surface of the contaminated nutrient medium at equal distances from each other and at approximately distance of 2 cm from the edge of the cup. The plates were incubated in a thermostat for 18-20 hours at t 35-37 0C, with the bottom upside down.

Using a ruler or meter (caliper) the zone of inhibition around the disks, including the diameter of the disks to the nearest 1 mm was measured. At not sharply delineated edges of zones, or zones with

double contours measurements of a zone on the clearest contour were carried out.

The discs with Tobramycin (SD044 Tobramycin 10 µg) and Nystatin (SD025 Nystatin NS 100 Units) manufactured by HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. were used as a reference drug.

RESULT AND DISCUSSION

Chemical Part

For the synthesis of ylidenhydrazides of 2-((4-R-5-R₁-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetaldehydes (**3a-m**) in quality of an initial matter 2-((4-R-5-R₁-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetaldehydes **2a-c** were used. The reaction of producing products **3a-m** were conducted by condensation of **2a-c** compounds with acetohydrazide (**3a-c**), benzohydrazide (**3d, 3e**), 3-nitrobenzohydrazide (**3f-h**), 4-nitrobenzohydrazide (**3i, 3j**), nicotinohydrazide (**3k**) and isonicotinohydrazide (**3l, 3m**). The structure confirmation of the synthesized compounds (**3a-m**) was released by **IR** (Infrared of spectroscopy), **¹H-NMR** (Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy), **EA** (Elemental of analyses). Individuality and purity of compounds were confirmed by the method of **GS/MS** (gas chromatography-mass spectrometry) (Figure 1).

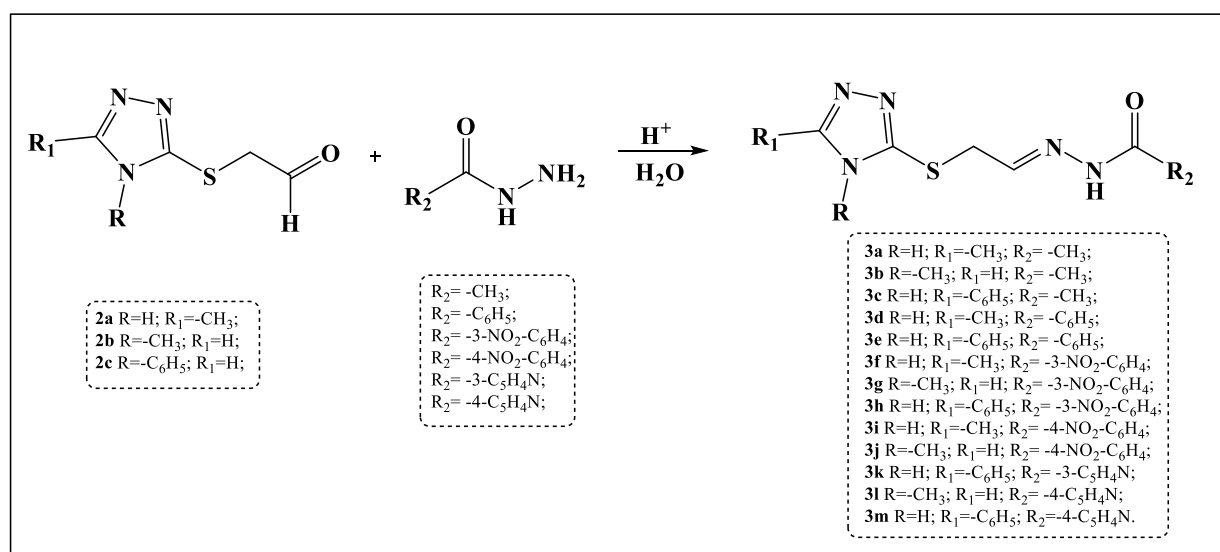


Figure 1. The synthesis of ylidenhydrazides of 2-((4-R-5-R₁-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetaldehydes (**3a-3m**)

The obtained data of elemental analysis values are corresponding to a theoretical data. Moreover, the individuality and molecular weight of compounds **3a-3m** are confirmed by GS/MS. In obtained chromatograms, individual peaks of the synthesized compounds are registered, and the mass spectra of these compounds showed a molecular peak matching to the theoretical mass.

In the IR-spectra of **3a-3m** compounds are present peaks of groups absorption in range 1644-1598 cm⁻¹ and 1685-1663 cm⁻¹, which belong to -C=N- and >C=O groups accordingly. The absorption peaks

of –C–S– groups are also present at 706-682 cm^{-1} and the bars of absorption are absent within the limits of 2600-2550 cm^{-1} that can testify to the absence in the molecule of –SH groups.

In the IR-spectra of 3f-3j compounds found out the characteristic vibrations of aromatic O2N-groups within the range of 1351-1343 cm^{-1} . Compounds of 3k- 3m own the characteristic valency vibrations of pyridine cycle within the limits of 3041-3048 cm^{-1} .

In ^1H NMR spectra of **3a**, **3b**, **3d**, **3f**, **3g**, **3h**, **3i**, **3j**, **3l** compounds proton –CH= group resonate by triplet within 7.50-7.59 ppm, in compounds **3c**, **3e**, **3m** in the kind of multiplets displacement is determined within 7.50-7.53 ppm. It is important to note that signals of proton-NH- group in the remnants of hydrazides of carbonic acids are specific to synthesized compounds and resonate by monoprotone singlets within 7.0-6.89 ppm. The exception is **3j** compound, where there is the shielding of proton-NH- group by multiplet of protons of aromatic cycle on the 7.26 ppm.

Methylene protons of -S-CH₂-group are displayed as a singlet 1.75 ppm. (**3j**) and doublets within 1.91, 1.81, 0.87, 3.16, 1.60 ppm. (**3e**, **3g**, **3k**, **3l**, **3m**). Analysing **3b** and **3c** compounds we noted that singlets of protons of methyl group in the remnants of hydrazide of acetic acid resonate within 0.86 and 1.16 ppm accordingly. In **3g** and **3l** compounds are the displacement of protons of methyl group of 1,2,4-triazole cycle in as a singlet with the meaning of 3.60 and 2.77 ppm. However, in **3j** compound the given protons resonate as a doublet with the meaning 3.60 ppm.

The protons of 4-pyridine cycle show up as doublets: 8.59, 7.30 ppm (compound **3l**) and 8.59, 7.31 ppm (compound **3m**). In ^1H of NMR spectrum of compound **3k** the signals of pyridine-3-cycle protons are present as a triplet (8.49 ppm), multiplet (7.75 ppm) and doublet (7.48 ppm).

Biological Part

Analysing the obtained data from Table 1 we can consider that new derivatives of 1,2,4-triazole shows selective antimicrobial activity. The compounds **3a** and **3i** deserves special attention. Thus, **3a** compound can inhibit considerably the growth of 4 species of microorganisms (**P.a.**, **Sta.s.**, **S.a.** **S.p.**) starting from 0,2% concentration. It is necessary to note that namely above compound in 0,5% concentration is active against **P.v** with zone of inhibition (**ZOI**) around the disks 23 mm. Paying attention to the substance **3i**, it can be stated that it is in maximum concentration quite active against **Sta.s.** and **S.p.** (**ZOI** 25 and 26 mm). Such results of the antimicrobial activity of compounds **3a** and **3i** are most likely caused by the positive effect of the starting aldehyde molecule (**2a**). Replacement of the methyl radical (**3a**) by the 4-nitrophenyl (**3i**) at the R₂ position leads to an increasing of the strength of antimicrobial activity against **Sta.s.** and **S.p.**, but the breadth of the spectrum of antibacterial action is reduced. Changing the location of the methyl radical from C₅ (**3a**) to N₄ (**3b**) of the 1,2,4-triazole ring is also accompanied by a narrowing of the spectrum of antimicrobial action. Instead, there is a pronounced antimicrobial effect against **C.p.** (**3b**). Replacement of the methyl radical (**3a**, **3c**) with phenyl (**3d**, **3e**) in acid hydrazides leads to a decreasing of antimicrobial activity.

A rather interesting picture emerges in the detailed analysis of compounds **3f**, **3g** and **3h**. From a chemical point of view, these condensed systems differ only in the substituents at the N₄ and C₅ atoms of the 1,2,4-triazole ring. In contrast to compounds **3a** and **3b**, the change of methyl radical from R position (**3g**) to R₁ position (**3f**) in ylidenehydrazide molecules leads to a weakening of the antimicrobial action, but the replacement of the same radical (**3f**) by phenyl fragment (**3h**) gives a selective antimicrobial activity against **E.c.**. It should be noted that this effect of the phenyl substituent at the C₅ atom of 1,2,4-triazole is not unambiguous. Thus, comparing compounds **3c** and **3h**, it can be concluded that the selective bacteriostatic effect is manifested precisely by the introduction of the 3-nitrophenyl radical in R₂ position.

During interpretation of the obtained results, attention should be paid to the influence of the position of the aromatic nitro group on the results of biological screening. It is interesting to note that the transition from the meta- (**3g**) to para- (**3j**) position of the nitro group has almost no effect on the intensity of antimicrobial action, but in case with compounds **3f** and **3i** such a transition is accompanied by a wide range of antimicrobial action. Also, it is possible to state that the introduction of 3-, 4-pyridyl substituents into synthesized molecules, unfortunately, does not lead to the manifestation of high results of antimicrobial action. The biological screening did not reveal compounds that are able to sufficiently inhibit the growth of the **C**.

General Produce of the Ylidenehydrazides of 2-((4-R-5-R₁-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetaldehydes (3a-3m)

To 0.01 mol of compound initial aldehydes **2a-2c** in 20 ml of concentrated acetic acid the 0.01 mol of corresponding hydrazide were added and heated to boiling. Then, solution set at room temperature for 12 hours to form a precipitate, which filtered, washed with diethyl ester and dried at air. For further studies, the obtained substances for analysis are recrystallized from acetic acid.

N'-(2-((5-methyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)ethylidene)acetohydrazide **3a**: Yellow solid with 81% yield, m.p. 189-191 °C; IR (KBr) cm⁻¹: 3084 (aromatic CH); 1687 (C=O); 1618 (-C=N-); 1594 (N-H+C-N); 688 (-C-S-); ¹H NMR (400 Mz, DMSO_d₆) δ ppm: 7.79 (s, 1H, 1,2,4-triazole-H), 7.51 (t, 1H, -CH=N-), 6.90 (s, 1H, =N-NH-), 3.78 (s, 3H, -CH₃), 3.25 (d, 2H, -CH₂), 1.71 (s, 3H, -C(O)CH₃); GS/MS: 213 (m/z); Anal. Calcd. for C₇H₁₁N₅OS: C, 39.42; H, 5.20; N, 32.84; S, 15.05. Found: C, 39.76; H, 5.24; N, 32.95; S, 15.09.

N'-(2-((4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)ethylidene)acetohydrazide **3b**: Yellow solid with 65% yield, m.p. 210-212 °C; IR (KBr) cm⁻¹: 3089 (aromatic CH); 1685 (C=O); 1620 (-C=N-); 1591 (N-H+C-N); 682 (-C-S-); ¹H NMR (400 Mz, DMSO_d₆) δ ppm: 7.71 (s, 1H, 1,2,4-triazole-H), 7.53(t, 1H, -CH=N-), 6.94 (s, 1H, =N-NH-), 3.72 (s, 3H, -CH₃), 3.29 (d, 2H, -CH₂), 1.74 (s, 3H, -C(O)CH₃); GS/MS: 213 (m/z); Anal. Calcd. for C₇H₁₁N₅OS: C, 39.42; H, 5.20; N, 32.84; S, 15.05. Found: C, 39.55; H, 5.18; N, 32.74; S, 15.08.

N'-(2-((5-phenyl-1*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)ethylidene)acetohydrazide **3c**: Yellow solid with 80% yield, m.p. 240-242 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3090 (aromatic CH); 1680 (C=O); 1644 (-C=N-); 1578 (N-H+C-N); 693 (-C-S-); ^1H NMR(400 Mz, DMSO d_6) δ ppm: 13.49 (s, 1H, NH-triazole), 8.09 (d, 2H, Ar), 7.54 (m, 3H, Ar), 7.01(t, 1H, -CH=N-), 6.69 (s, 1H, =N-NH-), 3.97 (d, 2H, -CH $_2$), 2.01 (s, 3H, -CH $_3$); GS/MS: 275 (m/z); Anal. Calcd. for C $_{12}$ H $_{13}$ N $_5$ O $_2$ S: C, 52.35; H, 4.76; N, 25.44; S, 11.65. Found: C, 52.28; H, 4.75; N, 25.49; S, 11.61.

N'-(2-((5-methyl-1*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)ethylidene)benzohydrazide **3d**: Yellow solid with 79% yield, m.p. 202-204 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3079 (aromatic CH); 1684 (C=O); 1614 (-C=N-); 1571 (N-H+C-N); 681 (-C-S-); ^1H NMR(400 Mz, DMSO d_6) δ ppm: 13.57 (s, 1H, NH-triazole), 8.31 (d, 2H, Ar), 8.19 (d, 2H, Ar), 7.65 (t, 1H, Ar), 7.20 (t, 1H, -CH=N-), 7.04 (s, 1H, =N-NH-), 3.75 (s, 3H, -CH $_3$), 3.21 (d, 2H, -CH $_2$); GS/MS: 275 (m/z); Anal. Calcd. for C $_{12}$ H $_{13}$ N $_5$ O $_2$ S: C, 52.35; H, 4.76; N, 25.44; S, 11.65. Found: C, 52.29; H, 4.81; N, 25.48; S, 11.60.

N'-(2-((5-phenyl-1*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)ethylidene)benzohydrazide **3e**: Orange solid with 79% yield, m.p. 179-181 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3075 (aromatic CH); 1686 (C=O); 1613 (-C=N-); 1573 (N-H+C-N); 689 (-C-S-); ^1H NMR(400 Mz, DMSO d_6) δ ppm: 13.52 (s, 1H, NH-triazole), 8.43 (d, 2H, Ar), 8.15 (d, 2H, Ar), 7.74 (m, 6H, Ar), 7.22 (t, 1H, -CH=N-), 7.00 (s, 1H, =N-NH-), 3.19 (d, 2H, -CH $_2$); GS/MS: 337 (m/z); Anal. Calcd. for C $_{17}$ H $_{15}$ N $_5$ O $_2$ S: C, 60.52; H, 4.48; N, 20.76; S, 9.50. Found: C, 60.38; H, 4.50; N, 20.82; S, 9.48.

N'-(2-((5-methyl-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)ethylidene)-3-nitrobenzohydrazide **3f**: Brown solid with 68% yield, m.p. 156-158 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3504 (aromatic NH); 3089 (aromatic CH); 1684 (C=O); 1612 (-C=N-); 1574 (N-H+C-N); 1524, 1356 (aromatic NO $_2$) 701 (-C-S-); ^1H NMR (400 Mz, DMSO d_6) δ ppm: 8.17 (s, 1H, 1,2,4-triazole-H), 7.65 (m, 4H, Ar), 7.33 (t, 1H, -CH=N-), 7.01 (s, 1H, =N-NH-), 3.50 (s, 3H, -CH $_3$), 3.04 (d, 2H, -CH $_2$); GS/MS: 320 (m/z); Anal. Calcd. for C $_{12}$ H $_{12}$ N $_6$ O $_3$ S: C, 44.99; H, 3.78; N, 26.24; S, 10.01. Found: C, 45.13; H, 3.74; N, 26.19; S, 10.06.

N'-(2-((4-methyl-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)ethylidene)-3-nitrobenzohydrazide **3g**: Red solid with 81% yield, m.p. 222-224 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3500 (aromatic NH); 3087 (aromatic CH); 1680 (C=O); 1610 (-C=N-); 1569 (N-H+C-N); 1528, 1351 (aromatic NO $_2$) 706 (-C-S-); ^1H NMR (400 Mz, DMSO d_6 +CCl $_4$) δ ppm: 8.14 (s, 1H, 1,2,4-triazole-H), 7.69 (m, 4H, Ar), 7.37 (t, 1H, -CH=N-), 7.06 (s, 1H, =N-NH-), 3.59 (s, 3H, -CH $_3$), 3.01 (d, 2H, -CH $_2$); GS/MS: 320 (m/z); Anal. Calcd. for C $_{12}$ H $_{12}$ N $_6$ O $_3$ S: C, 44.99; H, 3.78; N, 26.24; S, 10.01. Found: C, 44.80; H, 3.76; N, 26.20; S, 10.09.

N'-(2-((5-phenyl-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)ethylidene)-3-nitrobenzohydrazide **3h**: Red solid with 83% yield, m.p. 185-187 °C; IR (KBr) cm^{-1} : 3505 (aromatic NH); 3089 (aromatic CH); 1681 (C=O); 1612 (-C=N-); 1563 (N-H+C-N); 1532, 1348 (aromatic NO $_2$) 702 (-C-S-); ^1H NMR (400 Mz, DMSO d_6) δ ppm: 8.49 (d, 2H, Ar), 8.19 (s, 1H, 1,2,4-triazole-H), 8.11 (d, 2H, Ar), 7.64 (m, 5H, Ar), 7.35 (t, 1H, -CH=N-),

7.04 (s, 1H, =N-NH-), 3.09 (d, 2H, -CH₂); GS/MS: 382 (m/z); Anal. Calcd. for C₁₇H₁₄N₆O₃S: C, 53.40; H, 3.69; N, 21.98; S, 8.39. Found: C, 53.17; H, 3.72; N, 21.81; S, 8.47.

N'-(2-((5-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)ethylidene)-4-nitrobenzohydrazide **3i**: Yellow solid with 74% yield, m.p. 194-196 °C; IR (KBr) cm⁻¹: 3331 (aromatic NH); 3270 (-CH₃); 1670 (C=O); 1604 (-C=N-); 1548 (N-H+C-N); 1508, 1341 (aromatic NO₂), 690 (-C-S-); ¹H NMR (400 Mz, DMSO-d₆) δ ppm: 8.59 (s, 1H, 1,2,4-triazole-H), 8.21 (d, 1H, Ar), 8.01 (d, 1H, Ar), 7.52 (t, 1H, -CH=N-), 7.09 (s, 1H, =N-NH-), 3.84 (s, 3H, -CH₃), 3.60 (d, 2H, -CH₂); GS/MS: 320 (m/z); Anal. Calcd. for C₁₂H₁₂N₆O₃S: C, 44.99; H, 3.78; N, 26.24; S, 10.01. Found: C, 44.80; H, 3.82; N, 26.35; S, 10.05.

N'-(2-((4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)ethylidene)-4-nitrobenzohydrazide **3j**: Orange solid with 71% yield, m.p. 119-121 °C; IR (KBr) cm⁻¹: 3327 (aromatic NH); 3274 (-CH₃); 1674 (C=O); 1599 (-C=N-); 1555 (N-H+C-N); 1515, 1343 (aromatic NO₂), 697 (-C-S-); ¹H NMR (400 Mz, DMSO-d₆) δ ppm: 8.55 (s, 1H, 1,2,4-triazole-H), 8.28 (d, 1H, Ar), 8.17 (d, 1H, Ar), 7.53 (t, 1H, -CH=N-), 7.04 (s, 1H, =N-NH-), 3.80 (s, 3H, -CH₃), 3.62 (d, 2H, -CH₂); GS/MS: 320 (m/z); Anal. Calcd. for C₁₂H₁₂N₆O₃S: C, 44.99; H, 3.78; N, 26.24; S, 10.01. Found: C, 45.17; H, 3.76; N, 26.34; S, 9.94.

N'-(2-((5-phenyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)ethylidene)nicotinohydrazide **3k**: Grey solid with 91% yield, m.p. 182-184 °C; IR (KBr) cm⁻¹: 3041 (pyridine); 1679 (C=O); 1645 (-C=N-); 1568 (N-H+C-N); 686 (-C-S-); ¹H NMR(400 Mz, DMSO-d₆+CCl₄) δ ppm: 13.53 (s, 1H, NH-triazole), 8.64 (d, 2H, Ar), 8.51 (s, 1H, pyridine-H), 7.59 (m, 3H, Ar), 7.39 (t, 1H, -CH=N-), 6.96 (m, 3H, pyridine-H), 6.42 (s, 1H, =N-NH-), 1.61 (d, 2H, -CH₂); GS/MS: 338 (m/z); Anal. Calcd. for C₁₆H₁₄N₆OS: C, 56.79; H, 4.17; N, 24.84; S, 9.49. Found: C, 56.65; H, 4.13; N, 24.79; S, 9.54.

N'-(2-((4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)ethylidene)isonicotinohydrazide **3l**: Grey solid with 84% yield, m.p. 232-234 °C; IR (KBr) cm⁻¹: 3048 (pyridine); 1663 (C=O); 1598 (-C=N-); 1557 (N-H+C-N); 699 (-C-S-); ¹H NMR (400 Mz, DMSO-d₆) δ ppm: 8.54 (d, 2H, pyridine-H), 8.25 (s, 1H, 1,2,4-triazole-H), 7.53 (t, 1H, -CH=N-), 7.22 (d, 2H, pyridine-H), 6.95 (s, 1H, =N-NH-), 3.15 (d, 2H, -CH₂), 2.78 (s, 3H, -CH₃); GS/MS: 276 (m/z); Anal. Calcd. for C₁₁H₁₂N₆OS: C, 47.81; H, 4.38; N, 30.41; S, 11.60. Found: C, 47.65; H, 4.41; N, 30.30; S, 11.54.

N'-(2-((5-phenyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)ethylidene)isonicotinohydrazide **3m**: Yellow solid with 93% yield, m.p. 170-172 °C; IR (KBr) cm⁻¹: 3042 (pyridine); 1681 (C=O); 1639 (-C=N-); 1572 (N-H+C-N); 690 (-C-S-); ¹H NMR (400 Mz, DMSO-d₆) δ ppm: 13.51 (s, 1H, NH-triazole), 9.06 (d, 2H, pyridine-H), 8.71 (d, 2H, Ar), 8.41 (d, 2H, pyridine-H), 7.69 (m, 3H, Ar), 7.42 (t, 1H, -CH=N-), 6.94 (s, 1H, =N-NH-), 3.09 (d, 2H, -CH₂); GS/MS: 338 (m/z); Anal. Calcd. for C₁₆H₁₄N₆OS: C, 56.79; H, 4.17; N, 24.84; S, 9.48. Found: C, 56.91; H, 4.19; N, 24.71; S, 9.41.

As a result of this work, the new series of ylidenhydrazides of 2-((4-R-5-R₁-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetaldehydes were synthesized. The antimicrobial activity was studied for 13 new compounds on 10 strains of microorganisms in 3 different concentrations (0.1; 0.2; 0.5%). According to the results

of the study, some regularities the dependence "structure-activity" have been established. The obtained results can serve as a basis for the targeted search for compounds with pronounced antibacterial action. There is no doubt that the nature of microorganisms, chemical structure and antimicrobial variations are interrelated. Increasing the concentration of test substances is predicted increasing the antimicrobial activity in almost all cases. The most active compound in our study is N'-(2-((5-methyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)ethylidene)-4-nitrobenzohydrazide **3i** (ZOI **Sta.s.** and **S.p** in 0.5% at the level of 25 and 26 mm, respectively).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are highly thankful to the The Ministry of Education and Science of Ukraine for financial support which was given according to scientific topic № 0120U101649 "Synthesis, modification and study of the properties of 1,2,4-triazole derivatives for the purpose of antimicrobial drug production"

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: *R.S., O. PAN*; Design: *O. POL., N.N., M.D.*; Control: *R.S., O. PAN.*; Sources: *O. POL., N.N.*; Materials: *M.D.*; Data Collection and / or Processing: *R.S., O. PAN, O. POL., N.N., M.D.*; Analysis and / or Interpretation: *O. PAN., O. POL.*; Literature Review: *M.D.*; Manuscript Writing: *R.S.*; Critical Review: *R.S., O. PAN, O. POL., N.N., M.D.*

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Mathers, C.D. (2020). History of global burden of disease assessment at the World Health Organization. *Archives of Public Health*, 78(1), 1-13. [CrossRef]
2. World Health Statistic Web site (2020). Retrieved Mach 01, 2020, from <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332070/9789240005105-eng.pdf>. Accessed date 01.05.2021.
3. Wilson, D.N., Hauryliuk, V., Atkinson, G.C., O'Neill, A.J. (2020). Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. *Nature Reviews Microbiology*, 18(11), 637-648. [CrossRef]
4. Samelyuk, Y.G., Kaplaushenko, A.G. (2014). Synthesis of 3-alkylthio(sulfo)-1,2,4-triazoles, containing methoxyphenyl substituents at C₅ atoms, their antipyretic activity, propensity to

- adsorption and acute toxicity. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(5), 1117-1121. Retrieved May 01, 2021, from <https://www.jocpr.com/articles/synthesis-of-3alkylthiosulfo124triazoles-containing-methoxyphenyl-substituents-at-c5-atoms-their-antipyretic-activity-pr.pdf>
5. Bushueva, I., Parchenko, V., Shcherbyna, R., Safonov, A., Kaplaushenko, A., Gutytj, B., Hariv, I. (2017). Tryfuzol-new original veterinary drug. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 41(1), 42-49. [CrossRef]
 6. 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. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 42(1), 43-52. Retrieved May 01, 2021, from <https://dergipark.org.tr/en/pub/jfpanu/issue/42653/514314>
 7. 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). [CrossRef]
 8. Aljamali, N.M., Mahmood, R.M.U., Baqi, R.A. (2020). Review on preparation and application fields of triazole & tetrazole derivatives. *International Journal of Analytical and Applied Chemistry*, 6(1), 50-60. Retrieved May 01, 2021, from <http://chemical.journalspub.info/>
 9. Sumrra, S.H., Habiba, U., Zafar, W., Imran, M., Chohan, Z.H. (2020). A review on the efficacy and medicinal applications of metal-based triazole derivatives. *Journal of Coordination Chemistry*, 73(20-22), 2838-2877. [CrossRef]
 10. Frolova, Y., Kaplaushenko, A., Nagornaya, N. (2020). Design, synthesis, antimicrobial and antifungal activities of new 1,2,4-triazole derivatives containing 1H-tetrazole moiety. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 44(1), 70-88. [CrossRef]
 11. 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. [CrossRef]
 12. Peyton, L.R., Gallagher, S., Hashemzadeh, M. (2015). Triazole antifungals: a review. *Drugs Today (Barc)*, 51(12), 705-718. [CrossRef]
 13. Christenson, J.C., Korgenski, E.K., Relich, R.F. (2018). Laboratory diagnosis of infection due to bacteria, fungi, parasites, and rickettsiae. In: Sarah S. Long (Ed.), *In Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*, (pp. 1422-1434). Philadelphia: Elsevier.
 14. Tenover, F. (2015). Antimicrobial susceptibility testing. In: Thomas M. Schmidt (Ed.), *Reference Module In Biomedical Sciences*, (pp. 166-175). Amsterdam: Elsevier.
 15. Principles of anti-infective therapy Web site (2015). Retrieved January 01, 2015, from <https://yixueshu.gitee.io/cecil/> Accessed date 01.05.2021
 16. CLSI (2020). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, p.332.



ISOLATION OF NEWLY ISOLATED VB_K1 BACTERIOPHAGE AND INVESTIGATION OF SUSCEPTIBILITY ON ESBL POSITIVE KLEBSIELLA SPP. STRAINS

YENİ İZOLE EDİLEN VB_K1 BAKTERİYOFAJININ İZOLASYONU VE ESBL POZİTİF
KLEBSİELLA TÜRLERİ ÜZERİNE DUYARLILIĞININ ARAŞTIRILMASI

Hilal Basak EROL^{1,*} , Banu KASKATEPE¹ 

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

ABSTRACT

Objective: *The decrease in the efficacy of antimicrobials in the treatment of Klebsiella-related infections necessitated the search for alternative treatment strategies. This study aims to provide isolation of lytic bacteriophage specific to Klebsiella species and to investigate its potential for use as alternative antimicrobial agent.*

Material and Method: *One Extended spectrum beta lactamase (ESBL) producer Klebsiella strain was used as host bacteria and water samples were collected from river in Ankara for bacteriophage isolation. Spot test method was applied to determine the possible presence of bacteriophage after phage enrichment. To confirm the presence of the lytic bacteriophage, double layer agar method was applied to spot test positive samples. The susceptibility of the bacteriophage was determined using in vitro spot test. 38 clinical ESBL positive Klebsiella spp. strains were used for this analysis.*

Result and Discussion: *In the initial screening, the vB_K1 bacteriophage producing visible plaques with a diameter of 1.00 mm was isolated in the petri dish. The susceptibility of ESBL positive Klebsiella spp. strains to this bacteriophage was determined as 73.7%. It was proved that vB_K1 bacteriophage is very effective to Klebsiella spp. strains. However, in vitro bacteriophage susceptibility of characterized bacteriophage is encouraging development.*

Keywords: *Bacteriophage, resistance, ESBL, Klebsiella spp.*

ÖZ

Amaç: *Klebsiella ile ilişkili enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antimikrobiklerin etkinliğindeki azalma, alternatif tedavi strateji arayışlarını gerektirmiştir. Bu çalışma Klebsiella türlerine özgü litik karakterde bakteriyofaj izolasyonunun sağlanmasını ve alternatif antimikrobiyal ajan olarak kullanım potansiyelinin araştırılmasını amaçlamaktadır.*

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Hilal Basak Erol
e-mail / e-posta: hcuhadaroglu@ankara.edu.tr, **Phone / Tel:** +903122033187

Gereç ve Yöntem: Ankara deresinden alınan su örneklerinden faj izolasyonu için, Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreticisi bir adet *Klebsiella spp.* suşu konak bakteri olarak kullanıldı. Faj zenginleştirme sonrası, olası bakteriyofaj varlığını belirlemek için spot test yöntemi uygulandı. Litik bakteriyofaj varlığı, spot testi pozitif numunelere çift tabaka agar yöntemi uygulanarak doğrulandı. Bakteriyofajın duyarlılığı, 38 klinik GSBL pozitif *Klebsiella spp.* suşu kullanılarak in vitro spot test ile belirlendi.

Sonuç ve Tartışma: İlk taramada petride 1.00 mm çapında görünür plaklar üreten vB_K1 bakteriyofajı izole edildi. GSBL pozitif *Klebsiella spp.* suşlarının bakteriyofaj duyarlılığı %73.7 olarak belirlendi. vB_K1 bakteriyofajının *Klebsiella* suşları üzerinde çok etkili olduğu kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, karakterize edilen bakteriyofajın in vitro bakteriyofaj duyarlılığı cesaret verici bir gelişmedir.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyofaj, direnç, ESBL, *Klebsiella spp.*

INTRODUCTION

Klebsiella spp. belong to the family Enterobacteriaceae and are found in human microbiota, especially in the gastrointestinal, respiratory tracts and skin. It is an opportunistic pathogen that can cause a wide variety of community-acquired and nosocomial infections, such as urinary tract infections, respiratory tract infections, wound and soft tissue infections [1]. Resistance to antimicrobials is increasing day by day and β -lactamase production is an important resistance mechanism among them. Pathogens that produce extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) show resistance not only to third-generation cephalosporins and monobactams, but also to other classes of antibiotics [2]. ESBL resistance genes are located on plasmids and therefore are carried and cause significant infections in other strains. This causes an increase in infection control problems [3].

Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producer *Klebsiella spp.* are among the six drug-resistant microorganisms for which new therapies are urgently needed. Furthermore, ESBL positive *Klebsiella* infections cause serious morbidity and mortality in humans, increasing healthcare costs and treatment burden [4]. Alternative or complementary therapies for these infections are required.

Bacteriophages are defined as bacterial viruses and they show specific effects to their specific target bacteria. The existence of bacteriophages first emerged in 1896 when M. Ernest Hankin observed that people washed by the Ganges river waters of India did not contract cholera. Felix d'Herelle named "invisible microbe of the dysentery bacillus" as bacteriophage in 1917 and was the first to announce the antimicrobial effect of bacteriophages to the world [5]. Bacteriophages are defined as bacterial viruses that target and kill their specific bacteria. It was used clinically for the first time in 1919 by Felix D'Herelle in France [6]. Bacteriophages, which were thought to be used as antibacterial material, were used in the treatment of many diseases such as upper respiratory tract infections, abscesses, burns and inflamed wounds in a few countries such as Georgia, Poland, former Russia and the USA until the 1940s. With the discovery of antibiotics in 1941, bacteriophage therapy somehow fell into the background, but in the Soviet line countries (in the early 1990s) while the civil war continued, it continued to be used in the treatment of soldiers against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Streptococcus pyogenes* bacteria [7].

Bacteriophages can be found wherever bacteria are found. Bacteria can be found in almost any environment, such as seawater, fresh water and soil, so bacteriophages can be found anywhere they host [8]. In addition to their therapeutic usage, they can be used in many areas such as disinfection, bacterial identification, determination of subtypes of bacterial strains, in food and livestock conservation [9].

Bacteriophages basically have two life cycles, in some, both life cycles can be seen. Bacteriophages in the lytic life cycle are called virulent (lytic) bacteriophages, while bacteriophages in the lysogenic life cycle are called lysogenic bacteriophages [10]. In the lytic bacteriophages used in the treatment, the target bacteria are broken down and hundreds of phage progeny are released [11]. In the treatment of bacteriophage, it is important that the bacteriophage has a strong lytic effect and has a high host cell specificity [12].

To develop an effective antimicrobial agent, previously studies have been isolated and characterized bacteriophages specific for *Klebsiella spp.*, especially *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) [13-16]. The objective of this work was to isolate potentially therapeutic bacteriophage against ESBL positive *Klebsiella* strains. We also determined the in vitro susceptibility of 38 previously characterized ESBL-producing *Klebsiella spp.* to a newly isolated bacteriophage.

MATERIAL AND METHOD

Bacteriophage Isolation

One ESBL producer *Klebsiella spp.* strain was used as host bacteria and water samples were collected from river in Ankara for bacteriophage isolation. Spot test method was applied to determine the possible presence of bacteriophage after phage enrichment. For this, the water sample was centrifuged and the particles in it were removed, and the supernatant was passed through a 0.22 μm membrane filter. Fresh bacteria culture was cultivated in x2 Luria Bertani Broth (Merck) medium enriched with CaCl_2 and MgSO_4 and incubated at 37 °C for one night. After incubation, the suspension was centrifuged to remove the cell debris and particles, and bacteria were killed by addition of supernatant to 10% chloroform. For spot test, a strip of fresh bacterial culture was inoculated into petri dishes containing the medium, and 10 μL of the possible bacteriophage suspension obtained was dripped onto these areas. At the end of one-night incubation, the presence of zones in the cultivation areas was evaluated [17].

To confirm the presence of the lytic bacteriophage, a double layer agar method was applied to spot test positive samples. The supernatant was mixed with fresh bacterial culture and soft agar (0.6% agar) and spread on agar plate (1.5% agar). After one-night incubation at 37 °C, the petri dishes were evaluated for the presence of bacteriophage plaques [18, 19].

Single Plaque Isolation

Single plaque isolation was performed from one of the petri dishes in which bacteriophage plaque was detected. The plaque was cut from the area with a sterile pasteur pipette and transferred to 3 mL Luria Bertani broth medium. Fresh bacterial culture was added on it 3 mL more Luria Bertani broth was added on it and incubated at 37 °C. The next day, the bacteriophage suspension was centrifuged at 5000 rpm for 10 minutes and passed through a 0.22 µm membrane filter. The double layer agar method was applied to the dilutions of the bacteriophage. This stage will be repeated at least 5 times [20, 21].

Preparation of Concentrated Bacteriophage Suspension

In order to obtain the concentrated bacteriophage suspension, double layer agar was applied to the dilution where the phage and the host achieved the most appropriate growth together. The next day, the soft agar portion was taken with a Drigalski spatula, filtered through 0.22 µm membrane filter. The bacteriophage titer was determined as 'plaque forming unit' (PFU) using the double layer agar method by making 10-fold serial dilutions.

The Susceptibility of Bacteriophage

The susceptibility of the bacteriophage was determined using in vitro spot test. 38 clinical ESBL positive *Klebsiella spp.* strains were used for this analysis. All strains were spread evenly on the LB agar plate. After drying, 10 µL of the phage culture of 10⁸ PFU/mL was dropped onto the overlaid top agar. After culturing for 18 h at 37 °C, the presence or absence of a lysis zone was evaluated [22].

RESULT AND DISCUSSION

Klebsiella is a clinically important pathogen causing a variety of antibiotic resistant infections. The fact that ESBL-producing *K. pneumoniae* strains even become resistant to carbapenems increases the incidence of infections caused by these strains. As well as the increase in *Klebsiella* infections in community and hospital settings, there are many studies on bacteriophages, which are seen as an alternative to treatment [23]. There are a number of considerations in the selection of bacteriophages as therapeutic antimicrobial agents. Firstly, the bacteriophages must be effective at killing *Klebsiella*. Bacteriophages produce large, clear plaques containing large numbers of phage particles, allowing the bacteria to break down rapidly. In addition, bacteriophages with a wide host range are considered to be more beneficial than those with a narrow host range. Second, compared to lysogenic bacteriophages, which integrate their genetic information into the host genome and remain dormant for an indefinite period, lytic bacteriophages clear bacteria quickly and efficiently [24]. This demonstrates the necessity of characterizing bacteriophages before selecting them for therapeutic use.

In our study, one *Klebsiella spp.* isolate was used to find lytic bacteriophage from the collection of water samples obtained from the river water. Among all, one filtrate produced clear zones against the host

bacteria was selected. A newly isolated bacteriophage was named vB_K1. The vB_K1 bacteriophage produced visible plaques on the bacterial lawns 1.00 mm diameter in the initial screening using plaque assay (Figure 1). The susceptibility to vB_K1 bacteriophage was determined on 38 previously described as ESBL-producing *Klebsiella spp.* isolates. Ten of these were *K. pneumoniae*. Among the 38 *Klebsiella spp.* strains 29/38 (73.7%) were susceptible to vB_K1 bacteriophage, but 9/38 (26.3%) strains were resistant to vB_K1 bacteriophage. The effect of phage on *K. pneumoniae* strains were 76.9%. The phage was considered to have high activity against *Klebsiella spp.*. The results are given in Table 1.

Townsend et al. isolated and characterized 30 *Klebsiella* bacteriophages, distinct lineages, using multiple water samples from different environments and a number of different *Klebsiella spp.*. They reported in this study that bacteriophages were included in 5 phylogenetic groups and the broadest spectrum vB_KoM-MeTiny bacteriophage had 79% lytic activity [25]. In another study, Wintachai et al. reported that KP1801 bacteriophage isolated from hospital wastewater lysed 50% (10/20) of clinical strains [16]. Similarly, Karumidze et al. reported that one or more of the six phages was capable of efficiently lysing 63% of *Klebsiella* strains comprising a collection of 123 clinical isolates from Georgia and the United Kingdom [26].

Karamodini et al. isolate bacteriophages against *Klebsiella spp.* and evaluate their efficacy against 72 antibiotic-resistant isolates. At the same time, they reported that the use of bacteriophages in high concentration (over 10^7 PFU/mL) increased the effect [27]. Domingo-Calap et al. characterized two newly isolated *K. pneumoniae* bacteriophages, π VLC5 and π VLC6, from environmental samples as possible therapeutic agents by phenotypic and genomic tests [13]. In another study, Kawa et al. was found that 42 of 101 *K. pneumoniae* isolates (41.6%) were susceptible to newly isolate bacteriophage KP34. They also was found that 47.1% of ESBL (+) and 36% of ESBL (-) strains were susceptible to KP34 phage [28].

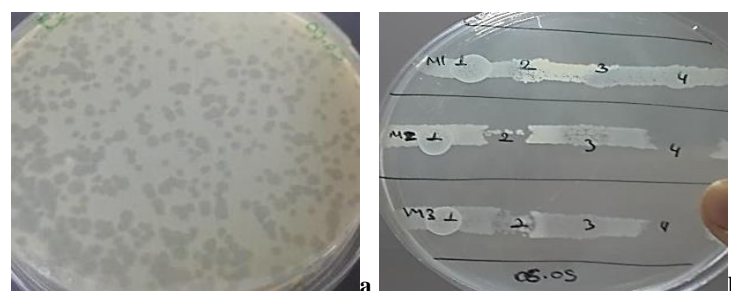


Figure 1. (a) vB_K1 bacteriophage plaque, (b) Spot test results.

Bacteriophage therapy holds promise as a potential response to inhibit the development and spread of MDR *Klebsiella* species. In vitro and in vivo studies have confirmed the potential use of bacteriophages individually, as bacteriophage cocktails, and in combination with existing antimicrobial chemotherapeutic drugs. In addition, the routine use of bacteriophage therapy in Eastern Europe and the

results of several clinical studies in the West indicate that bacteriophages are considered safe for use in humans. Eventually, it was proved that isolation and in vitro phage susceptibility results of vB_K1 bacteriophage are promising for *Klebsiella* species for which there are no ready to use phage preparations, but more detailed characterization studies are needed.

Table 1. Bacteriophage susceptibilities of *Klebsiella spp.* strains

Number	Strain No		vB_K1 bacteriophage
1	384	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	-
2	379	ESBL <i>K. pneumoniae</i>	+++
3	364 (host)	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	+++
4	285	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	-
5	205	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	+
6	378	ESBL <i>K. pneumoniae</i>	+++
7	382	ESBL <i>K. pneumoniae</i>	-
8	240	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	++
9	405	ESBL <i>K. pneumoniae</i>	+++
10	206	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	-
11	305	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	+++
12	333	ESBL <i>K. pneumoniae</i>	+
13	166	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	+
14	172	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	+
15	200	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	-
16	434	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	-
17	455	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	++
18	338	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	+++
19	171	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	++
20	119	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	++
21	82	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	+
22	176	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	+++
23	227	ESBL <i>K. pneumoniae</i>	+++
24	454	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	+++
25	305	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	++
26	373	ESBL <i>K. pneumoniae</i>	-
27	379	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	+++
28	207	ESBL <i>K. pneumoniae</i>	+++
29	205	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	+
30	378	ESBL <i>K. pneumoniae</i>	+++
31	382	ESBL <i>K. pneumoniae</i>	-
32	240	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	++
33	405	ESBL <i>K. pneumoniae</i>	+++
34	206	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	-
35	305	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	+++
36	333	ESBL <i>K. pneumoniae</i>	+
37	201	ESBL <i>K. pneumoniae</i>	+++
38	178	ESBL <i>Klebsiella spp.</i>	+
Lytic Effect%			73.7

+++ : CL (Clear Lysis), ++ : SCL (Semi-Clear Lysis), + : OL (Opaque Lysis), - : No lysis [22].

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: *H.E, B.K.*; Design: *H.E, B.K.*; Supervision: *H.E, B.K.*; Resources: *H.E, B.K.*; Materials: *H.E, B.K.*; Data Collection and/or Processing: *H.E, B.K.* ; Analysis and/or Interpretation: *H.E, B.K.*; Literature Search: *H.E, B.K.*; Writing: *H.E, B.K.*; Critical Reviews: *H.E, B.K.*

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Podschun, R., Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(4), 589-603. [\[CrossRef\]](#)
2. Moxon, C. A., Paulus, S. (2016). Beta-lactamases in Enterobacteriaceae infections in children. *Journal of Infection*, 72 Suppl, S41-49. [\[CrossRef\]](#)
3. Bitsori, M., Galanakis, E. (2019). Treatment of urinary tract infections caused by ESBL-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae*. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 38(12), e332-e335. [\[CrossRef\]](#)
4. Peleg, A. Y., Hooper, D. C. (2010). Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *New England Journal of Medicine*, 362(19), 1804-1813. [\[CrossRef\]](#)
5. Golkar, Z., Bagasra, O., Pace, D. G. (2014). Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(2), 129-136. [\[CrossRef\]](#)
6. Chanishvili, N. (2012). *A literature review of the practical application of bacteriophage research*. New York: Nova Biomedical Books.
7. Bruttin, A., Brüssow, H. (2005). Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2874-2878. [\[CrossRef\]](#)
8. Domingo-Calap, P., Delgado-Martinez, J. (2018). Bacteriophages: protagonists of a post-antibiotic era. *Antibiotics (Basel)*, 7(3), 1-16. [\[CrossRef\]](#)
9. Kazi, M., Annapure, U. S. (2016). Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. *Journal of Food Science and Technology*, 53(3), 1355-1362. [\[CrossRef\]](#)
10. Guttman, B., Raya, R., Kutter, E. (2005). Basic phage biology. *Bacteriophages: Biology and applications*, 4.

11. Harper, D. R., Parracho, H. M. R. T., Walker, J., Sharp, R., Hughes, G., Werthén, M., Morales, S. (2014). Bacteriophages and biofilms. *Antibiotics*, 3(3), 270-284. [\[CrossRef\]](#)
12. Kochetkova, V. A., Mamontov, A. S., Moskovtseva, R. L., Erastova, E. I., Trofimov, E. I., Popov, M. I., Dzhubalieva, S. K. (1989). Phagotherapy of postoperative suppurative-inflammatory complications in patients with neoplasms. *Sovetskaia Meditsina*, (6), 23-26.
13. Domingo-Calap, P., Beamud, B., Mora-Quilis, L., González-Candelas, F., Sanjuán, R. (2020). Isolation and characterization of two *Klebsiella pneumoniae* phages encoding divergent depolymerases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3160. [\[CrossRef\]](#)
14. Karamodini, M. K., Fazli-Bazzaz, B. S., Emamipour, F., Ghannad, M. S., Jahanshahi, A. R., Saed, N., & Sahebkar, A. (2011a). Antibacterial efficacy of lytic bacteriophages against antibiotic-resistant *Klebsiella* species. *The Scientific World Journal*, 11, 370161. [\[CrossRef\]](#)
15. Kumari, S., Harjai, K., Chhibber, S. (2011). Bacteriophage versus antimicrobial agents for the treatment of murine burn wound infection caused by *Klebsiella pneumoniae* B5055. *Journal of Medical Microbiology*, 60(Pt 2), 205-210. [\[CrossRef\]](#)
16. Wintachai, P., Naknaen, A., Thammaphet, J., Pomwised, R., Phaonakrop, N., Roytrakul, S., Smith, D. R. (2020). Characterization of extended-spectrum- β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* phage KP1801 and evaluation of therapeutic efficacy in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, 10(1), 11803. [\[CrossRef\]](#)
17. Adams, M. H. (1959). *Bacteriophages*: Interscience publishers.
18. Merabishvili, M., Pirnay, J.-P., Verbeken, G., Chanishvili, N., Tediashvili, M., Lashkhi, N., Vaneechoutte, M. (2009). Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS One*, 4(3), e4944-e4944. [\[CrossRef\]](#)
19. Oliveira, H., Pinto, G., Oliveira, A., Oliveira, C., Faustino, M. A., Briers, Y., Azeredo, J. (2016). Characterization and genome sequencing of a *Citrobacter freundii* phage CfP1 harboring a lysin active against multidrug-resistant isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(24), 10543-10553. [\[CrossRef\]](#)
20. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*: Cold spring harbor laboratory press.
21. Sasikala, D., Srinivasan, P. (2016). Characterization of potential lytic bacteriophage against *Vibrio alginolyticus* and its therapeutic implications on biofilm dispersal. *Microbial Pathogenesis*, 101, 24-35. [\[CrossRef\]](#)
22. Knezevic, P., Kostanjsek, R., Obrecht, D., Petrovic, O. (2009). Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* specific phages with broad activity spectra. *Current Microbiology*, 59(2), 173. [\[CrossRef\]](#)
23. Herridge, W. P., Shibu, P., O'Shea, J., Brook, T. C., Hoyles, L. (2020). Bacteriophages of *Klebsiella* spp., their diversity and potential therapeutic uses. *Journal of Medical Microbiology*, 69(2), 176-194. [\[CrossRef\]](#)
24. Harper, D. R. (2018). Criteria for selecting suitable infectious diseases for phage therapy. *Viruses*, 10(4), 177. [\[CrossRef\]](#)

25. Townsend, E. M., Kelly, L., Gannon, L., Muscatt, G., Dunstan, R., Michniewski, S., Jameson, E. (2021). Isolation and characterization of Klebsiella phages for phage therapy. *Phage (New Rochelle)*, 2(1), 26-42. [\[CrossRef\]](#)
26. Karumidze, N., Kusradze, I., Rigvava, S., Goderdzishvili, M., Rajakumar, K., Alavidze, Z. (2013). Isolation and characterisation of lytic bacteriophages of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. *Current Microbiology*, 66(3), 251-258. [\[CrossRef\]](#)
27. Karamodini, M. K., Fazli-Bazzaz, B. S., Emamipour, F., Ghannad, M. S., Jahanshahi, A. R., Saed, N., Sahebkar, A. (2011b). Antibacterial efficacy of lytic bacteriophages against antibiotic-resistant Klebsiella species. *The Scientific World Journal*, 11, 1332-1340. [\[CrossRef\]](#)
28. Drulis-Kawa, Z., Mackiewicz, P., Kęsik-Szeloch, A., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Weber-Dąbrowska, B., Dorotkiewicz-Jach, A., Kropinski, A. M. (2011). Isolation and characterisation of KP34—a novel ϕ KMV-like bacteriophage for *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(4), 1333-1345. [\[CrossRef\]](#)



SOME MEDICINAL PROPERTIES OF *GLYCYRRHIZA GLABRA* (LICORICE)

GLYCYRRHIZA GLABRA'NIN BAZI TIBBİ ÖZELLİKLERİ (MEYAN KÖKÜ)

Falah Saleh MOHAMMED¹ , Nuh KORKMAZ^{2*} , Mehmet DOĞAN³ ,
Ali Erdem ŞABİK⁴ , Mustafa SEVİNDİK³ 

¹Duhok University, Science Faculty, Department of Biology, 42001, Duhok, Iraq

²Osmaniye Korkut Ata University, Science and Literature Faculty, Department of Biology, 80000,
Osmaniye, Turkey

³Osmaniye Korkut Ata University, Bahçe Vocational School, Department of Food Processing,
80500, Osmaniye, Turkey

⁴Osmaniye Korkut Ata University, Bahce Vocational School, Department of Chemistry and Chemical
Processing Technologies, 80500, Osmaniye, Turkey

ABSTRACT

Objective: *Alternative medicine has an important place in the fight against many diseases in human history. The biological activity of Glycyrrhiza glabra L. was investigated in this study.*

Material and Method: *The root parts of the plant were extracted with ethanol. Antioxidant and oxidant potentials were determined using Rel Assay kits. Antimicrobial activity was tested against standard bacteria and fungus strains using the agar dilution method. Antiproliferative activity was determined by MTT test against Lung Carcinoma Cell Line (A549).*

Result and Discussion: *As a result of the studies, the TAS value of the plant was measured as 8.770±0.171, TOS value as 14.590±0.191 and OSI value as 0.167±0.005. Inhibition of the plant extract was observed against standard bacteria and fungus strains at ranging from 50-200 µg/mL concentrations. In addition, it was determined that the plant extract displayed strong antiproliferative activity due to the increase in concentration. As a result of these studies, it has been determined that G. glabra can be used as an important natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agent.*

Keywords: *Antimicrobial, antioxidant, antiproliferative, Glycyrrhiza glabra, medicinal plants*

ÖZ

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Nuh Korkmaz
e-mail / e-posta: korkmazhun@gmail.com, **Phone /Tel.:** +905050227978

Amaç: Alternatif tıp, insanlık tarihinde birçok hastalıkla mücadelede önemli bir yere sahiptir. Bu çalışmada *Glycyrrhiza glabra* L.'nin biyolojik aktivitesi araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Bitkinin kök kısımları etanol ile ekstrakte edildi. Antioksidan ve oksidan potansiyelleri Rel Assay kitleri kullanılarak belirlendi. Antimikrobiyal aktivite, agar seyreltme yöntemi kullanılarak standart bakteri ve mantar suşlarına karşı test edildi. Antiproliferatif aktivite, Lung Carcinoma Cell Line'a (A549) karşı MTT testi ile belirlendi.

Sonuç ve Tartışma: Çalışmalar sonucunda bitkinin TAS değeri 8.770 ± 0.171 , TOS değeri 14.590 ± 0.191 ve OSI değeri 0.167 ± 0.005 olarak ölçülmüştür. Bitki ekstraktının 50-200 µg/mL konsantrasyon aralığında standart bakteri ve mantar suşlarına karşı inhibisyonu gözlemlendi. Ayrıca bitki ekstraktının konsantrasyon artışına bağlı olarak güçlü antiproliferatif aktivite gösterdiği belirlendi. Bu çalışmalar sonucunda *G. glabra*'nın önemli bir doğal antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser ajanı olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal, antioksidan, antiproliferatif, *Glycyrrhiza glabra*, tıbbi bitkiler

INTRODUCTION

Many natural materials such as mushrooms, plants and animals are used in alternative medicine [1]. It occupies a very important place in the treatment of diseases due to the active substances produced by the plants. Many studies have shown that plants have anticancer, antioxidant, antimicrobial, antiproliferative, anti-inflammatory, DNA protective, antiallergic and hepatoprotective activities [2-4]. In our study, *Glycyrrhiza glabra* L. (Licorice) was used as a material.

Licorice; It is a plant belonging to the genus *Glycyrrhiza glabra*, of the genus *Glycyrrhiza* of the Papilionaceae family. It is used for therapeutic purposes known in the history of ancient medicine in many civilizations such as Sumer, Mesopotamia, China, Greek and Egypt in the world. Among the aromatic and medicinal plants, the licorice plant is popularly known by 14 different names such as "biyam, dye, piyam, sweet root, etc." [5]. Licorice plant in the world at 12, while in Turkey in 6 species of yellow-blue or brown color, is a perennial shrub plant ranging between 30-160 cm in length [6]. The roots of the licorice plant are biologically known as a source of magnesium and silicon. In addition, the active ingredient in the composition of the licorice plant, glycyrrhizin is 50 times sweeter than tea sugar and 150 times sweeter than sucrose. Glycyrrhiza acid, which is found in the sweetness of the roots, and its calcium and potassium salts, two of the substances such as sucrose and mannite come from [7, 8]. Therefore, as much more intense taste is obtained with less amount, it has been involved in the cuisine and food industry of many countries for centuries [9].

In addition, in the production of licorice honey, licorice sherbet, in the manufacture of tobacco, snuff and filter cigarettes, in the confectionery and beverage industry as a fragrance and flavoring, in cosmetics, velvet dyeing and shoe dyeing in the textile industry, making foam in fire fighting, in preparations prepared to kill insects, and in the food industry, there are areas of use such as adding fragrance to foods [10-12]. Licorice plant is widely used in food, confectionery, medicine and tobacco products as a flavoring agent known worldwide as "generally safe" (GRAS) [13]. In this study, antioxidant, oxidant, antimicrobial and antiproliferative activity of ethanol extract of root parts of *G. glabra* was determined.

MATERIAL AND METHOD

Laboratory Studies

Plant samples were collected from Duhok (Iraq). Soil and dust particles were removed from the root parts of the plant. It was then dried under suitable conditions. After drying the plant parts were pulverized and weighed 30 g. It was then extracted with ethanol for about 6 hours, for example at 50 °C. The solvents of the extracts were removed in a rotary evaporator and crude extracts were obtained.

Antioxidant Parameters

The antioxidant and oxidant status of the plant extract was determined using Rel Assay TAS and TOS kits. TAS tests were performed according to the protocol specified in Erel [14] and Trolox was used as a calibrator. Results are shown in mmol Trolox equiv./L. TOS tests were performed according to the protocol specified in Erel [15] and hydrogen peroxide was used as a calibrator. Results are shown as $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv./L. The oxidative stress index (OSI) was determined by proportioning the TOS value to the TAS value [16].

Antimicrobial Activity Tests

The antimicrobial activity of the root parts of the plant against EtOH extract bacteria and fungus strains was determined using the agar dilution method [17-19]. The plant extract was adjusted with distilled water at 800-12.5 $\mu\text{g/mL}$ concentrations. Bacterial strains were set in Muller Hinton Broth medium. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* MRSA ATCC 43300, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 were used as bacterial strains. Fungus strains were pre-cultured in RPMI 1640 Broth medium. *Candida albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 34135 and *C. glabrata* ATCC 90030 were used as fungus strains. The extract concentration that inhibits the growth of bacteria and fungus strains was determined as the MIC value. Results were expressed in $\mu\text{g/mL}$ [20-22].

Antiproliferative Activity Tests

The antiproliferative activity of the EtOH extract of the plant was determined by MTT test on A549 lung cancer cells. Cells were separated after 70-80% confluence using 3.0 mL of Trypsin-EDTA solution (Sigma-Aldrich, MO, USA). It was then planted on plates and incubated for 24 hours. The plant extract (25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$) was then adjusted at different concentrations. After the incubation period, the supernatants were dissolved in growth medium and replaced with 1 mg/mL MTT (Sigma). It was then incubated at 37 °C until a purple precipitate formed. The supernatants were then removed and dissolved by adding dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, MO, USA) to MTT absorbed by cells. Subsequently, plates were read at 570 nm using an Epoch spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooska, VT) [23].

RESULT AND DISCUSSION

Antioxidant Activity

In recent years, it is known that the basis of many diseases are due to oxidative stress caused by reactive oxygen species. Oxidative stress is due to the disproportion between the formation and neutralization of prooxidants [24]. The level of endogenous oxidant compounds resulting from environmental factors as a result of metabolic activities is highly toxic when they accumulate in organisms. The antioxidant defense system plays a role in reducing the effects of oxidant compounds. If the antioxidant defense system is insufficient, oxidative stress occurs. In such cases, supplemental antioxidants are important in reducing the effect of oxidative stress. In this context, it is very important to identify new natural antioxidant agents [25]. In our study, the antioxidant and oxidant potentials of *G. glabra* were determined. The results obtained are shown in Table 1.

Table 1. Antioxidant and oxidant status of *G. glabra*.

	TAS (mmol/L)	TOS (μ mol/L)	OSI
<i>G. glabra</i>	8.770 \pm 0.171	14.590 \pm 0.191	0.167 \pm 0.005

* Values are presented as mean \pm S.D.

In previous studies of *G. glabra*, it was reported that aqueous, methanol, ethanol extracts have antioxidant potential using different methods (Inhibition of b-carotene–linoleate bleaching, Hypochlorous acid-scavenging activity, Inhibition of myeloperoxidase-chlorinating system, Nitric oxide radical scavenging activity, Superoxide anion scavenging activity, Hydroxyl radical scavenging activity, DPPH radical scavenging activity, ABTS^{•+} cation Radical Scavenging, Fe²⁺/ascorbate induced lipid peroxidation assay, Reducing power) [26-29]. In our study, TAS, TOS and OSI values were determined for the first time by using Rel Assay kits of *G. glabra*. As a result of the studies, it has been determined that *G. glabra* has an important antioxidant activity. In addition, TAS values of *R. coriaria* var. *zebaria*, *M. longifolia* subsp. *longifolia*, *A. calocephalum*, *S. papposa*, *F. platycarpa*, *T. spicata*, *G. tournefortii*, *R. crispus* and *A. millefolium* reported in the literature were reported as 7.342, 3.628, 5.853, 5.314, 5.688, 8.399, 6.831, 6.758 and 2.436 mmol/L, respectively. TOS values were reported as 5.170, 4.046, 16.288, 24.199, 15.552, 6.530, 3.712, 5.802 and 2.839 μ mol/L, respectively. OSI values were reported as 0.071, 0.112, 0.278, 0.456, 0.273, 0.078, 0.054, 0.086 and 0.083, respectively [30-38].

Compared to these studies, the TAS value of *G. glabra* was determined to be higher than *R. coriaria* var. *zebaria*, *M. longifolia* subsp. *longifolia*, *A. calocephalum*, *S. papposa*, *F. platycarpa*, *T. spicata*, *G. tournefortii*, *R. crispus* and *A. millefolium*. TAS value shows all of the antioxidant compounds produced in the plant [30]. As seen in our study, it has been determined that *G. glabra* has a very important antioxidant potential.

When TOS values were examined, it was determined that *G. glabra* was lower than *S. papposa* and *F. platycarpa*, and higher than *Rhus coriaria* var. *zebaria*, *Mentha longifolia* subsp. *longifolia*, *A. calocephalum*, *T. spicata*, *G. tournefortii*, *R. crispus* and *A. millefolium*. The TOS value indicates all of the oxidant compounds produced by the environmental effects in the plant [30]. It is seen that the oxidant levels of the plant used in our study are at normal levels.

When OSI values were examined, it was determined that *G. glabra* was lower than *A. calocephalum*, *S. papposa* and *F. platycarpa*, and higher than *R. coriaria* var. *zebaria*, *M. longifolia* subsp. *longifolia*, *T. spicata*, *G. tournefortii*, *R. crispus* and *A. millefolium*. The OSI value shows how much oxidant compounds produced in the plants are suppressed by the antioxidant defense system. A low OSI value indicates that the antioxidant defense system of the plant works well [30]. In our study, it was determined that the antioxidant defense system of *G. glabra* was sufficient in suppressing oxidant compounds. As a result, it was determined that *G. glabra* has significant antioxidant activity.

Antimicrobial Activity

Today, many diseases occur due to microorganisms. Antibiotics are used extensively in the treatment of microorganism-based diseases. Today, resistant strains are emerging due to the unconscious use of antibiotics [39]. Antibiotics used against resistant microorganisms are insufficient. In addition, due to the possible side effects of chemical antibiotics, the tendency towards natural products is increasing. In this context, the discovery of new antimicrobial drugs is inevitable [40]. In this study, the activities of *G. glabra* against bacteria and fungi were investigated. The results obtained are shown in Table 2.

Table 2. Antimicrobial Activity of *G. glabra*.

	A	B	C	D	E	F	G	H	J
EtOH	50	50	100	200	100	25	25	25	50

* (A) *S. aureus*, (B) *S. aureus* MRSA, (C) *E. faecalis*, (D) *E. coli*, (E) *P. aeruginosa*, (F) *A. baumannii*, (G) *C. glabrata*, (H) *C. albicans*, (J) *C. krusei*

*200, 100, 50 and 25 µg/mL extract concentrations

In previous studies, it has been reported that methanol extracts of *G. glabra* are effective against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *Sarcina lutea*, *Salmonella paratyphi*, *S. typhi*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio minicus*, *V. parahemolyticus* and *Pseudomonas aeruginosa* at different concentrations [41]. In a different study, ethanol extracts of *G. glabra* were reported to be effective against *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* [42]. Ethanolic, hexane fraction, ethyl acetate fraction and methanol fraction of *G. glabra* have been reported to be effective against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter*

aerogens and *Escherichia coli* [43]. In our study, *G. glabra* was determined to be effective against *A. baumannii*, *C. glabrata* and *C. albicans* at 25 $\mu\text{g/mL}$, *S. aureus*, *S. aureus* MRSA and *C. krusei* at 50 $\mu\text{g/mL}$, *E. faecalis* and *P. aeruginosa* at 100 $\mu\text{g/mL}$, *E. coli* at 200 $\mu\text{g/mL}$ extract concentrations. As a result, it was determined that *G. glabra* has antibacterial and antifungal activities.

Antiproliferative Activity

Cancer is one of the leading causes of death in the world where uncontrolled growth is seen in one or more cells and surgery, chemotherapy and/or radiotherapy are applied in treatment steps [44]. Today, as a result of the increase in cancer incidence due to different reasons, treatments using cytotoxic drugs have become widespread [45]. Demand for cytotoxic drugs is expected to increase, especially in the coming years, due to the increase in the population sensitive to cancer. In this context, the detection of new natural anticancer agents is of great importance. Plants are important natural agents thanks to the metabolites they contain [46, 47]. In our study, the activity of EtOH extract of *G. glabra* on Lung Carcinoma Cell Line (A549) was determined. The findings obtained are shown in figure 1.

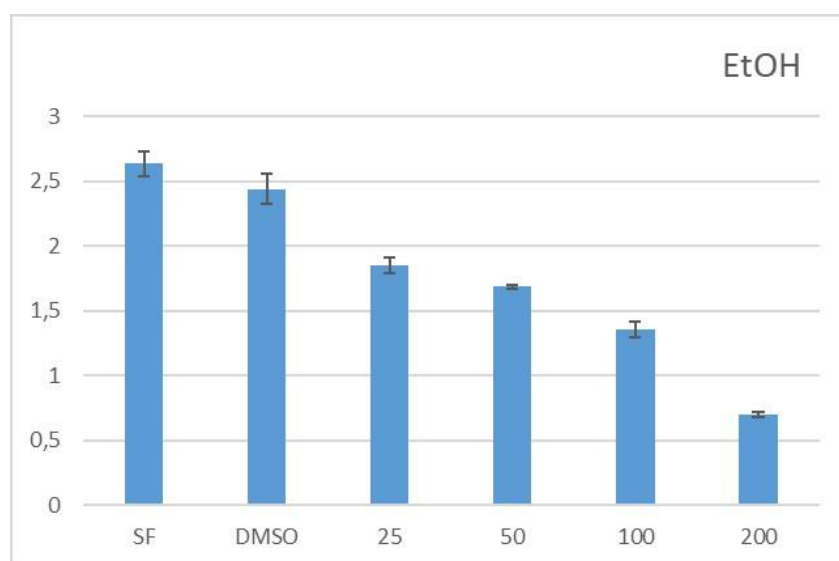


Figure 1. Antiproliferative activity of *G. glabra*

In previous studies, chloroform, methanol and water extracts of *G. glabra* were reported to be effective against MCF7 cell line [48]. Essential oil of *G. glabra* has been reported to be effective at different levels on MCF-7 and HT29 cell lines [49]. In our study, it was determined that EtOH extract of *G. glabra* exhibited strong cytotoxic effects on the A549 cell line due to the dose increase. The strongest activity was seen at 200 $\mu\text{g/mL}$ concentration. As a result, it has been determined that *G. glabra* can be used as a natural anticancer source.

Conclusion

In this study, some medicinal properties of the root parts of *G. glabra* were determined. As a result of the studies, it was determined that the root extracts of the plant exhibit significant antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activity. As a result, it is thought that *G. glabra* can be used as a natural material in pharmacological designs.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: F.S.M., N.K., M.G., A.E.Ş., M.S.; Design: F.S.M., N.K., M.G., A.E.Ş., M.S.; Control: F.S.M., N.K., M.G., A.E.Ş., M.S.; Sources: F.S.M.; Materials: F.S.M., N.K., M.G., A.E.Ş., M.S.; Data Collection and/or processing: F.S.M., N.K., M.G., A.E.Ş., M.S.; Analysis and/or interpretation: F.S.M., N.K., M.G., A.E.Ş., M.S.; Literature review: F.S.M., N.K., M.G., A.E.Ş., M.S.; Manuscript writing: F.S.M., N.K.; Critical review: F.S.M., N.K., M.G., A.E.Ş., M.S.; Other: F.S.M., N.K., M.S.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Korkmaz, A.I., Akgul, H., Sevindik, M., Selamoglu, Z. (2018). Study on determination of bioactive potentials of certain lichens. *Acta Alimentaria*, 47(1), 80-87. [[CrossRef](#)]
2. Ben-Shabat, S., Yarmolinsky, L., Porat, D., Dahan, A. (2020). Antiviral effect of phytochemicals from medicinal plants: applications and drug delivery strategies. *Drug Delivery and Translational Research*, 10(2), 354-367. [[CrossRef](#)]
3. Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M.R., Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 80-89. [[CrossRef](#)]
4. Mohammed, F.S., Pehlivan, M., Sevindik, E., Akgul, H., Sevindik, M., Bozgeyik, I., Yumrutas, O. (2021). Pharmacological properties of edible *Asparagus acutifolius* and *Asparagus officinalis* collected from North Iraq and Turkey (Hatay). *Acta Alimentaria*, 50(1), 136-143. [[CrossRef](#)]
5. Pastorino, G., Cornara, L., Soares, S., Rodrigues, F., Oliveira, M.B.P. (2018). Liquorice (*Glycyrrhiza glabra*): A phytochemical and pharmacological review. *Phytotherapy research*, 32(12), 2323-2339. [[CrossRef](#)]
6. Kılınç, F., Demircan, F., Yıldırım, Y., Yılmaz, Z., Pekkolay, Z., Tuzcu, A.K. (2014). Meyan Kökü (Likoris) Kullanımına Bağlı Hipertansiyon ve Hipokalemi ile Seyreden 5 Vakanımı Değerlendirilmesi. *Sakarya Tıp Dergisi*, 4, 186-190. [[CrossRef](#)]

7. Nazari, S., Rameshrad, M., Hosseinzadeh, H. (2017). Toxicological effects of *Glycyrrhiza glabra* (licorice): a review. *Phytotherapy research*, 31(11), 1635-1650. [\[CrossRef\]](#)
8. Alagawany, M., Elnesr, S.S., Farag, M.R., El-Hack, A., Mohamed, E., Khafaga, A.F., Taha, A.E., Tiwari, R., Yatoo, M.I., Bhatt, P., Marappan, G., Dhama, K. (2019). Use of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) herb as a feed additive in poultry: Current knowledge and prospects. *Animals*, 9(8), 536. [\[CrossRef\]](#)
9. Cuvelier, M. E., Berset, C., Richard, H. (1994). Antioxidant Constituents in Sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and food chemistry*, 42, 665-669. [\[CrossRef\]](#)
10. Kikuzaki, H., Nakatani, N. (1993). Antioxidant Effects of Some ginger constituents. *Journal of food science*, 58, 1407-1410. [\[CrossRef\]](#)
11. Shahidi, F. (2000). Antioxidants in Food and Food Antioxidants. *Food/nahrung*, 44, 158-163. [\[CrossRef\]](#)
12. Dang, M.N., Takácsová, M., Nguyen, D.V., Kristiánová, K. (2001). Antioxidant Activity of Essential Oils from Various Spices. *Food/nahrung*, 45, 64-66. [\[CrossRef\]](#)
13. Jiang, J., Zhang, X., True, A.D., Zhou, L., Xiong, Y.L. (2013). Inhibition of Lipid Oxidation and Rancidity in Precooked Pork Patties by Radical-Scavenging Licorice (*Glycyrrhiza glabra*) Extract. *Journal of food science*, 78: 1686-1694. [\[CrossRef\]](#)
14. Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*, 37(4), 277-285. [\[CrossRef\]](#)
15. Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 38(12), 1103-1111. [\[CrossRef\]](#)
16. Sevindik, M., Akgul, H., Akata, I., Alli, H., Selamoglu, Z. (2017). Fomitopsis pinicola in healthful dietary approach and their therapeutic potentials. *Acta Alimentaria*, 46(4), 464-469. [\[CrossRef\]](#)
17. CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute). (2012). Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard—Eighth Edition (M11-A8). [\[CrossRef\]](#)
18. EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). (2014). Breakpoint tables Fungal isolate for interpretation of MICs. Version 7.0.
19. EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). (2015). Breakpoint tables for Bacteria interpretation of MICs and zone diameters, Version 5.0.
20. Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493-96.
21. Hindler, J., Hochstein, L., Howell, A. (1992). Preparation of routine media and reagents used in antimicrobial susceptibility testing. Part 1. McFarland standards, p. 5.19.1-5.19.6. In H. D. Isenberg (ed) *Clinical microbiology procedures handbook*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

22. Matuschek, E., Brown, D.F., Kahlmeter, G. (2014). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection* 20: 255-266. [\[CrossRef\]](#)
23. Bal, C., Akgul, H., Sevindik, M., Akata, I., Yumrutas, O. (2017). Determination of the anti-oxidative activities of six mushrooms. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26(10), 6246-6252.
24. Frattaruolo, L., Carullo, G., Brindisi, M., Mazzotta, S., Bellissimo, L., Rago, V., Curcio, R., Dolce, V., Aiello, F., Cappello, A. R. (2019). Antioxidant and anti-inflammatory activities of flavanones from *Glycyrrhiza glabra* L.(licorice) leaf phytocomplexes: Identification of licoflavanone as a modulator of NF- κ B/MAPK pathway. *Antioxidants*, 8(6), 186. [\[CrossRef\]](#)
25. Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C., Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177(1), 67-80. [\[CrossRef\]](#)
26. Visavadiya, N. P., Soni, B., Dalwadi, N. (2009). Evaluation of antioxidant and anti-atherogenic properties of *Glycyrrhiza glabra* root using in vitro models. *International journal of food sciences and nutrition*, 60(sup2), 135-149. [\[CrossRef\]](#)
27. Cheel, J., Van Antwerpen, P., Tůmová, L., Onofre, G., Vokurková, D., Zouaoui-Boudjeltia, K., Vanhaeverbeek, M., Nève, J. (2010). Free radical-scavenging, antioxidant and immunostimulating effects of a licorice infusion (*Glycyrrhiza glabra* L.). *Food Chemistry*, 122(3), 508-517. [\[CrossRef\]](#)
28. Mehreen, L., Lubna, I., Nudrat, F., Kauser, S., Nighat, A., Mansoor, A. (2012). Evaluation of antioxidant and urease inhibition activities of roots of *Glycyrrhiza glabra*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25(1): 99-102
29. Durmaz, H., Hülül, M., Celik, H. (2018). Meyan (*Glycyrrhiza glabra* L.) Bitkisinin Antibakteriyel ve Antioksidan Aktiviteleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 7, 37-41. [\[CrossRef\]](#)
30. Mohammed, F. S., Akgul, H., Sevindik, M., Khaled, B. M. T. (2018). Phenolic content and biological activities of *Rhus coriaria* var. *zebaria*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(8), 5694-5702.
31. Sevindik M, Akgul, H, Pehlivan M, Selamoglu Z (2017) Determination of therapeutic potential of *Mentha longifolia* ssp. *longifolia*. *Fresenius Environmental Bulletin* 26(7), 4757-4763
32. Mohammed, F. S., Karakaş, M., Akgül, H., Sevindik, M. (2019). Medicinal properties of *Allium calocephalum* collected from Gara Mountain (Iraq). *Fresenius Environmental Bulletin*, 28(10), 7419-7426.
33. Mohammed, F. S., Günal, S., Şabik, A. E., Akgül, H., Sevindik, M. (2020). Antioxidant and Antimicrobial activity of *Scorzonera papposa* collected from Iraq and Turkey. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 23(5), 1114-1118. [\[CrossRef\]](#)
34. Mohammed, F. S., Günal, S., Pehlivan, M., Doğan, M., Sevindik, M., Akgül, H. (2020). Phenolic content, antioxidant and antimicrobial potential of endemic *Ferulago platycarpa*. *Gazi University Journal of Science*, 33(4), 670-677. [\[CrossRef\]](#)



35. Mohammed, F. S., Şabik, A. E., Sevindik, E., Pehlivan, M., Sevindik, M. (2020). Determination of Antioxidant and Oxidant Potentials of *Thymbra spicata* Collected from Duhok-Iraq. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(5), 1171-1173. [\[CrossRef\]](#)
36. Saraç, H., Demirbaş, A., Daştan, S. D., Ataş, M., Çevik, Ö., Eruygur, N. (2019). Evaluation of Nutrients and Biological Activities of Kenger (*Gundellia tournefortii* L.) Seeds Cultivated in Sivas Province. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(sp2), 52-58. [\[CrossRef\]](#)
37. Daştan, S. D., Durukan, H., Demirbaş, A., Dönmez, E. (2019). Bioactivity and Therapeutic Properties of Evelik (*Rumex crispus*), A Naturally Growing and Edible Plant in Sivas Province. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(sp2), 67-71. [\[CrossRef\]](#)
38. Saraç, H., Durukan, H., Demirbaş, A. (2021). Nutrient Concentrations and Antioxidant Activity of *Achillea millefolium* L.(Yarrow), One of the Important Medicinal Plants. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 9(3), 590-594. [\[CrossRef\]](#)
39. Rios, J. L., Recio, M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1-2), 80-84. [\[CrossRef\]](#)
40. Jafarzadeh, S., Jafari, S. M., Salehabadi, A., Nafchi, A. M., Kumar, U. S. U., Khalil, H. A. (2020). Biodegradable green packaging with antimicrobial functions based on the bioactive compounds from tropical plants and their by-products. *Trends in Food Science & Technology*, 100, 262-277. [\[CrossRef\]](#)
41. Sultana, S., Haque, A., Hamid, K., Urmi, K. F., Roy, S. (2010). Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activity of methanolic extract of *Glycyrrhiza glabra*. *Agric Biol JN Am*, 1(5), 957-60. [\[CrossRef\]](#)
42. Irani, M., Sarmadi, M., Bernard, F. (2010). Leaves antimicrobial activity of *Glycyrrhiza glabra* L. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 9(4), 425.
43. Gupta, V. K., Fatima, A., Faridi, U., Negi, A. S., Shanker, K., Kumar, J. K., Rahuja, N., Luqman, S., Sisodia, B. S., Saikia, D., Darokar, M. P., Khanuja, S. P. (2008). Antimicrobial potential of *Glycyrrhiza glabra* roots. *Journal of ethnopharmacology*, 116(2), 377-380. [\[CrossRef\]](#)
44. Nussbaumer, S., Bonnabry, P., Veuthey, J. L., Fleury-Souverain, S. (2011). Analysis of anticancer drugs: a review. *Talanta*, 85(5), 2265-2289. [\[CrossRef\]](#)
45. Tariq, A., Sadia, S., Pan, K., Ullah, I., Mussarat, S., Sun, F., Abiodun, O. O., Batbaatar, A., Li, Z., Song, D., Xiong, D., Ullah, R., Khan, R., Basnet, B. H., Kumar, B., Islam, R., Adnan, M. (2017). A systematic review on ethnomedicines of anti-cancer plants. *Phytotherapy Research*, 31(2), 202-264. [\[CrossRef\]](#)
46. Buyel, J. F. (2018). Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents. *Biotechnology advances*, 36(2), 506-520. [\[CrossRef\]](#)
47. Aumeeruddy, M. Z., Mahomoodally, M. F. (2021). Global documentation of traditionally used medicinal plants in cancer management: A systematic review. *South African Journal of Botany*, 138, 424-494. [\[CrossRef\]](#)

48. Rathi, S. G., Suthar, M., Patel, P., Bhaskar, V. H., Rajgor, N. B. (2009). In-vitro cytotoxic screening of *Glycyrrhiza glabra* L.(Fabaceae): A natural anticancer drug. *Journal of Young Pharmacists*, 1(3), 239. [\[CrossRef\]](#)
49. Nazmi, S. A., Nourazarian, A., Bahhaj, R., Khakikhatibi, F. (2018). The anticancer effect of *Arctium lappa* and *Glycyrrhiza glabra* on HT-29 colon cancer and MCF-7 breast cancer cell lines. *cancer*, 6, 7.



SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF ACTIVE COMPOUNDS IN AN ANTIHYPERTENSIVE FORMULATION BY HAAR-CWT METHOD

*BİR ANTIHİPERTANSİF FORMÜLASYONDAKİ AKTİF BİLEŞİKLERİN HAAR-CWT
YÖNTEMİYLE SPEKTROFOTOMETRİK TAYİNİ*

Özgür ÜSTÜNDAĞ^{1,*} , Erdal DİNÇ¹ 

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

ABSTRACT

Objective: *In present work, we developed a new wavelet method (HAAR-CWT) to determine the amounts of irbesartan (IR) and hydrochlorothiazide (HC) active compounds simultaneously in an antihypertensive formulation, and after validating this method, we successfully applied it to the assay of tablets containing the above-mentioned compounds.*

Material and Method: *The absorption spectra of mixtures and tablet solutions in the spectral range 200-305 nm were measured by a Shimadzu UV-1601 dual-beam UV-VIS spectrophotometer.*

Result and Discussion: *Due to the strong overlapping spectra of the mentioned components, the HAAR-CWT method has been proposed and successfully applied to the ratio spectra of IR-HC mixtures and tablets.*

Keywords: *Spectrophotometry, quantitative determination, wavelet transform, irbesartan, hydrochlorothiazide*

ÖZ

Amaç: *Bu çalışmada, bir antihipertansif formülasyondaki irbesartan (IR) ve hidroklorotizid (HC) aktif bileşiklerinin miktarlarını aynı anda belirlemek için yeni bir dalgacık yöntemi (HAAR-CWT) geliştirdik ve bu yöntemi doğruladıktan sonra, yukarıda bahsedilen bileşikleri içeren tabletlerin analizine başarıyla uyguladık.*

Gereç ve Yöntem: *200-305 nm spektral aralığındaki karışımların ve tablet çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları, bir Shimadzu UV-1601 çift ışınlı UV-VIS spektrofotometresi ile ölçülmüştür.*

Sonuç ve Tartışma: *Bahsedilen bileşenlerin güçlü şekilde örtüşen spektrumları nedeniyle, HAAR-CWT yöntemi önerilmiş ve IR-HC karışımlarının ve tabletlerinin oran spektrumlarına başarıyla uygulanmıştır.*

Anahtar Kelimeler: *Spektrofotometri, kantitatif tayin, dalgacık dönüşümü, irbesartan, hidroklorotiyazid*

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Özgür Üstündağ
e-mail / e-posta: ustundag@pharmacy.ankara.edu.tr, **Phone / Tel:** +903122033171

INTRODUCTION

Nowadays, researchers seek to meet the needs of better scientific measurements or to evolve more efficient procedures and increase the reliability of existing analytical methods to achieve the desired analytical results in many disciplines [1-3].

For analytical studies, LC and CE methods have been used in conjunction with different spectroscopic systems (separate techniques, namely LC-MS and CE-MS) to obtain more chemical data and reduce the complication of multicomponent substance analysis. Furthermore, these combined unit methods involve high costs and time for analysis [4-6]. Analytical methods such as spectrophotometry [7], mass-spectrometry [8], chromatography [9] and electrophoresis [10], electrochemistry [11] and their joint devices have been used for analytical purposes. Because of the disadvantages of the mentioned separation techniques or combination analyzers, analytical chemists opt to use spectroscopic methods (rather than separation techniques) to enable rapid analysis at low cost. Nowadays, applications of wavelet transform (CWT) methods to the spectrophotometric data gaining popularity because it can be used in the analysis of components in complex systems without the need for any separation process. Therefore, CWT methods can offer suitable solutions for such cases. [12-14]. Several analytical methods for the analysis of IR and HC have been reported in pharmaceutical and biological studies, including spectrophotometric methods [15-19] and chromatographic methods [20-23].

In this study, we focused on developing a wavelet transform method in order to perform simultaneous analysis of the specified active ingredients in a tablet formulation containing irbesartan and hydrochlorothiazide, without the need for a pre-separation method.

MATERIAL AND METHOD

The absorption spectra of mixtures and tablet solutions in the spectral range 200-305 nm were measured by a Shimadzu UV-1601 dual-beam UV-VIS spectrophotometer with a constant gap width (2 nm). When applying the methods, Microsoft EXCEL and Wavelet Toolbox in Matlab 7.0 software were applied for calculations.

Commercial Tablet Product

A pharmaceutical tablet (KARVEZIDE® Tablet, Sanofi-Aventis. Ind., Istanbul, Turkey) including 150 mg IR and 12.5 mg HC per tablet was gathered from the Turkish market. IR and HC pure compounds were give away by National Pharm. Ind. Company, Turkey).

Standard Solutions

Standard IR and HC stock solutions were arranged respectively by dissolving 10 mg of each drug in 100 mL of methanol. A calibration ranges between 4.0-32.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for IR and 2.0-9.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ HC in

solvent was prepared for spectrum analysis from standard stock solutions for each active ingredient.

Sample Solutions Preparation

For testing tablets; twenty tablets of IR and HC were weighed and powdered. Transfer an equal amount of powder to a 100 ml volumetric flask and solved with methanol. The contents of the flask were mechanically stirred. After filtration, the supernatant is diluted with methanol to an ultimate concentration. This pocedure was repeated ten times.

RESULT AND DISCUSSION

The purpose of this work is to apply the HAAR-CWT method to the ratio-spectra of IR and HC in mixtures and preparations for the simultaneous assay. The IR and HC standards and the UV spectra of the tablet solution were measured between 200 and 305 nm as can be seen in Figure 1.

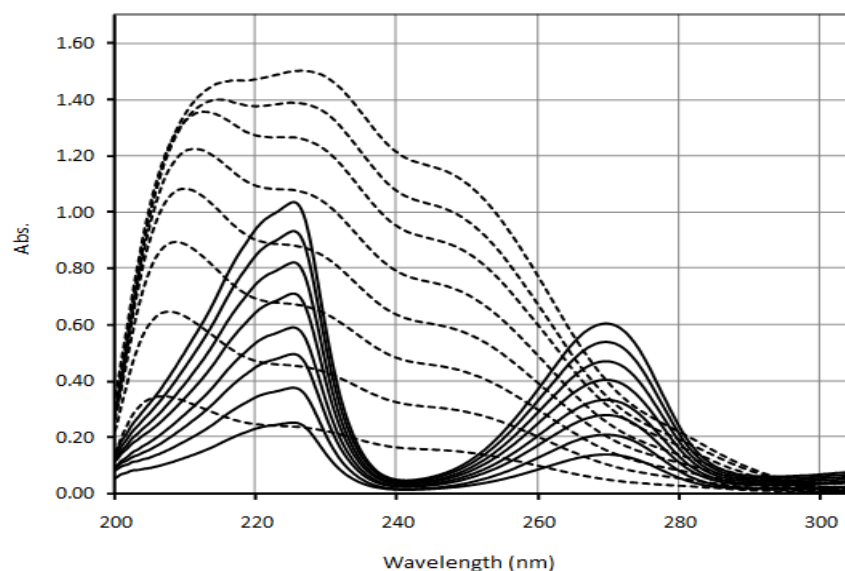


Figure 1. The UV-Absorption spectra of 4.0-32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ IR (---) and 2.0-9.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ HC (—) in methanol

HAAR Continuous Wavelet Transform-Ratio Spectra Method (HAAR-CWT-RS)

For the analysis of artificial mixtures and tablets containing IR and HC compounds by the HAAR-CWT-RS method, calibration mixtures were prepared as described in the above section, using methanol as a solvent in a linear concentration range of 4.0-32.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for IR and 2.0-9.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for HC. The original UV spectra of these calibration solutions were recorded in the 200-305 nm wavelength range with $\Delta\lambda = 0.1$ nm intervals and were coded and saved. The HAAR-CWT method applied to the ratio spectra of IR and HC (Figure 2 and Figure 3). Regression equation, correlation coefficient and their statistical data were shown in Table 1. The calibration equation of the HAAR-CWT-RS method was

validated by using the quantitative assay of artificial mixtures. Recovery results and with relative standard deviation were shown in Table 2.

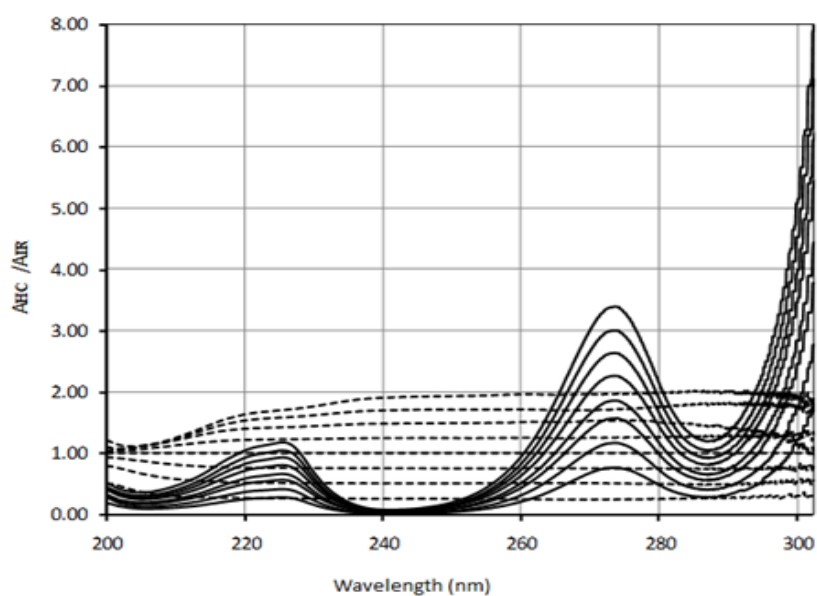


Figure 2. Ratio-spectra of IR (---) and HC (—) in methanol (Div: $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ IR)

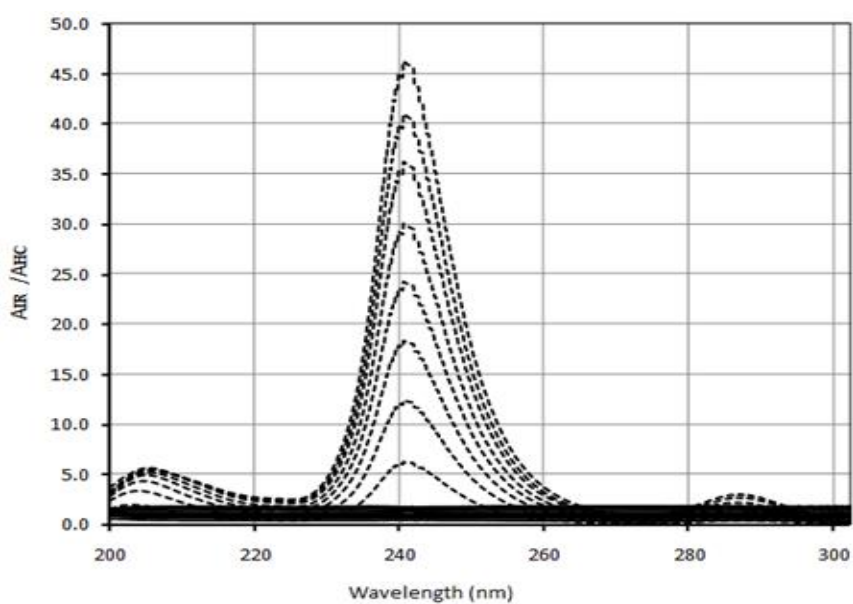


Figure 3. Ratio-spectra of IR (---) and HC (—) in methanol (Div: $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ HC)

The outcome of the regression analysis obtained are shown in Table 1. The amounts of IR and HC in the samples were computed using the calibration equations obtained from the linear regression analysis in Table 1.

Table1. Statistical outcome for the HAAR-CWT-RS method

Method Parameter	HAAR-CWT-RS	
	IR	HC
λ (nm)	236.7 (Div : 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ HC)	266 (Div : 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ IR)
m	-0.8931	-0.0128
n	-0.6052	-0.0128
r	0.9997	0.9997
SE(m)	0.0088	0.0012
SE(n)	0.0588	0.0070
SE(r)	0.0229	0.0076
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.56	0.50
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1.86	1.68

m = Slope of the linear regression equation; n = Intercept of the linear regression equation; r = Correlation coefficient; SE(m) = Standard error of slope; SE(n) = Standard error of intercept; SE(r) = Standard error of correlation coefficient; LOD = Limit of detection ($\mu\text{g mL}^{-1}$); LOQ = Limit of detection ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

Validation of the Proposed Methods

A validation kit consisting of 16 artificial solutions of dissimilar concentrations in methanol in a working range of 4.0-36.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for IR and 2.0-9.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ HC was produced. This validation set tested the accuracy and precision of the HAAR-CWT-RS method. The results gathered by performing the HAAR-CWT-RS method to artificial mixtures prepared as a verification set are shown in Table 2.

Table 2. Recovery outcome calculated by using artificial mixtures

HAAR-CWT-RS						
Added ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Found ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Recovery (%)		
IR	HC	IR	HC	IR	HC	
30	2.0	29.07	2.07	96.9	103.4	
30	3.0	28.86	3.01	96.2	100.2	
30	4.0	29.14	4.03	97.1	100.7	
30	5.0	28.99	5.06	96.6	101.1	
30	6.0	29.13	6.02	97.1	100.4	
30	7.0	29.05	7.02	96.8	100.3	
30	8.0	29.20	7.88	97.3	98.5	
30	9.0	29.08	8.88	96.9	98.6	
4.0	2.5	3.80	2.53	95.0	101.3	
8.0	2.5	7.83	2.48	97.8	99.1	
12	2.5	12.05	2.57	100.4	102.8	
16	2.5	16.25	2.50	101.6	100.1	
20	2.5	20.31	2.47	101.5	98.9	
24	2.5	24.17	2.51	100.7	100.3	
28	2.5	28.07	2.54	100.2	101.7	
32	2.5	31.70	2.54	99.1	101.6	
			Mean	100.6	100.9	
			SD	0.93	1.41	
			RSD	0.93	1.39	

SD= Standard deviation; RSD = Relative standard deviation

To appraise the accuracy and precision of the HAAR-CWT-RS method, precision and accuracy survey were applied daily at three dissimilar concentrations (4, 16 and 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for IR - 2, 5 and 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for HC) during the calibration of the HAAR-CWT-RS method. Thus, 6 dissimilar solutions were used and the prepared solutions were used for intra-day and inter-day studies. The results can be seen in Table 3.

Table 3. Intra-day and inter-day outcome by the HAAR-CWT-RS method

Intra-day Results						
	Added ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Found ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	SD	RSD	RE	Recovery (%)
IR	4	3.91	0.07	1.69	-2.27	97.7
	16	15.88	0.15	0.94	-0.74	99.3
	30	29.69	0.39	1.32	-1.02	100.1
HC	2	1.97	0.04	1.88	-1.58	98.4
	5	4.92	0.09	1.78	-1.57	98.4
	8	7.98	0.07	0.82	-0.21	99.8
Inter-day Results						
IR	4	3.96	0.05	1.31	-1.02	99.0
	16	15.82	0.13	0.84	-1.13	98.9
	30	29.30	0.13	0.45	2.33	97.7
HC	2	1.99	0.03	1.26	0.61	99.4
	5	4.90	0.09	1.92	-2.01	98.0
	8	7.93	0.07	0.84	-0.88	99.1

RE = Percent relative error

Before the HAAR-CWT-RS method was implemented to the commercial tablet preparation, a standard addition technique was used to test the interference effects of tablet excipients on IR and HC. The results can be seen in Table 4.

Recovery and other calculations for IR and HC were performed by subtracting the quantity of IR and HC from the tablets. These surveys were performed with five replicas at three dissimilar concentration grades.

Tablet Analysis

The outcomes gathered by applying the proposed technique to the IR-HC commercial preparation solutions are shown in Table 5. Accomplished results have been gathered for the quantification of tablets containing IR and HC. In the determination of tablets, no interference with the tablet excipients in the determination of the concerned compounds was monitored when the HAAR-CWT-RS method was applied to commercially available tablets.

Table 4. Standard addition outcome by the HAAR-CWT-RS method

	IR			HC		
	Added ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	4	8	12	2	4	8
No.	Found ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
1	3.97	8.06	12.21	2.03	4.13	8.05
2	4.02	8.27	12.40	2.05	4.13	7.99
3	4.03	8.05	12.51	2.06	4.14	8.01
4	3.95	8.13	12.35	2.09	4.07	8.02
5	4.08	8.23	12.37	2.07	4.10	7.99
	Recovery (%)					
No.	IR			HC		
1	99.3	100.8	101.7	101.6	103.3	100.6
2	100.4	103.3	103.4	102.3	103.1	99.8
3	100.7	100.6	104.2	103.1	103.4	100.1
4	98.7	101.6	103.0	104.7	101.7	100.2
5	102.0	102.9	103.1	103.7	102.6	99.9
Mean	100.2	101.9	103.1	103.1	102.8	100.1
SD	1.29	1.23	0.90	1.22	0.70	0.29
RSD	1.29	1.21	0.87	1.18	0.68	0.29
RE	0.24	1.85	3.06	3.08	2.82	0.13

RE = Percent relative error

To summarize the study briefly, the HAAR-CWT-RS method we have developed has been successfully applied to the spectral analysis of artificial mixtures and tablet formulations containing IR and HC. This method we have developed can be applied without requiring any pre-separation in cases where the spectra overlap each other in the same spectral region as in this study (see Figure 1). It was performed with analytical validation parameters to indicate the validity and applicability of the method.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: Ö.Ü., E.D.; Design: Ö.Ü.; Control: Ö.Ü.; Sources: Ö.Ü., E.D.; Materials: Ö.Ü., E.D.; Data Collection and/or processing: Ö.Ü.; Analysis and/or interpretation: Ö.Ü., E.D.; Literature review: Ö.Ü.; Manuscript writing: Ö.Ü., E.D.; Critical review: Ö.Ü.; Other: Ö.Ü. E.D.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Siddiqui M. R., AlOthman Z. A., Rahman N. (2017) Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, 1409-1421. [\[CrossRef\]](#)
2. Valagaleti R., Burns P.K., Gill M. (2003) Analytical support for drug manufacturing in the United States—from active pharmaceutical ingredient synthesis to drug product shelf life. *Drug Information Journal*, 37, 407-438. [\[CrossRef\]](#)
3. Ju H. (2013) Grand challenges in analytical chemistry: towards more bright eyes for scientific research, social events and human health. *Frontiers in Chemistry*, 1:5. [\[CrossRef\]](#)
4. Chhonker Y. S., Edi C., Murry D. J. (2018) LC–MS/MS method for simultaneous determination of diethylcarbamazine, albendazole and albendazole metabolites in human plasma: Application to a clinical pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 20-151, 84–90. [\[CrossRef\]](#)
5. Sáiz J., García-Ruiz C., Gómara B. (2017) Comparison of different GC-MS configurations for the determination of prevalent drugs and related metabolites. *Analytical Methods*, 9, 2897-2908. [\[CrossRef\]](#)
6. Maurer H. H. (1994) Toxicological analysis of drugs: GC-MS screening and confirmation. *Acta Medicinæ Legalis*, XLIV, 489-492.
7. Rocha F. R. P., Teixeira L. S. G. (2004) Strategies to increase sensitivity in UV-VIS spectrophotometry. *Quimica Nova*, 27(5), 807-812. [\[CrossRef\]](#)



8. Thiem T. L. (1994) Comparison of optical-emission mass-spectroscopy utilizing laser vaporization of solid samples for inorganic analysis. *American Laboratory*, 26(3), 48-52.
9. Deyl Z., Janak J., Schwarz V. (2001) Bibliography section - Liquid column chromatography - Gas chromatography - Planar chromatography - Gel chromatography - Capillary electrophoresis and electrokinetic chromatography. *Journal Of Chromatography A*, 940(2), 119-219.
10. Otieno A. C., Mwangela S. M. (2008) Capillary electrophoresis-based methods for the determination of lipids - A review. *Analytica Chimica Acta*, 624(2), 163-174. [\[CrossRef\]](#)
11. Naggar A. H., Kotb A., Abdelwahab A.A. (2021) Graphite studded with facile-synthesized Cu₂O nanoparticle-based cubes as a novel electrochemical sensor for highly sensitive voltametric determination of mebeverine hydrochloride. *Chemosensors*. [\[CrossRef\]](#)
12. Daubechies I. (1992) Ten Lectures on Wavelets, Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, 1-357.
13. Dinç E., Baleanu D. (2007) Continuous wavelet transform applied to the overlapping absorption signals and their ratio signals for the quantitative resolution of mixture of oxfendazole and oxcyclozanide in bolus. *Journal of Food and Drug Analysis*., 15(2), 109-117. [\[CrossRef\]](#)
14. Üstündağ Ö., Dinç E. (2021) Continuous wavelet transforms and ultra performance liquid chromatography applied to the simultaneous quantitative determination of candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide in tablets. *Monatshefte für Chemie*. [\[CrossRef\]](#)
15. Redasani V. K., Patel P. R., Marathe D.Y., Chaudhari S. R., Shirkhedkar A. A., Surana S. J. (2018) A review on derivative uv-spectrophotometry analysis of drugs in pharmaceutical formulations and biological samples review. *Journal of the Chilean Chemical Society*. [\[CrossRef\]](#)
16. Albero I., Rodenas V., Garcia S., Sanchez C. (2002) Determination of irbesartan in the presence of hydrochlorothiazide by derivative spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29(1-2), 299-305. [\[CrossRef\]](#)
17. El-Yazbi A., Hammud H., Sonji M. (2007) Analysis of eprosartan-hydrochlorothiazide and irbesartan -hydrochlorothiazide binary mixtures by derivative spectrophotometry. *International Journal of Applied Chemistry*., 3(1), 1-12.
18. Joseph J., Brault S., Boyer C., Langlois M., Cabrero L., Dubost J. (2003) Simultaneous determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in tablets by derivative spectrophotometry. *Analytical. Letters*, 36(11), 2485-2495. [\[CrossRef\]](#)
19. Kalyani G., Adjuad B. (2019) Stability indicating assay and estimation of irbesartan by first order uv derivative spectrophotometry. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 23, 3817-3821. [\[CrossRef\]](#)
20. Zhu J., You S., Meng X. (2003) Determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in compound irbesartan tablets by HPLC. *Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi*, 34(11), 567-569.

21. Tutunji L. F., Tutunji M. F., Alzoubi M. I., Khabbas M. H., Arida A. I. (2009) Simultaneous determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in human plasma using HPLC coupled with tandem mass spectrometry: Application to bioequivalence studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(4), 985-990. [\[CrossRef\]](#)
22. Alanazi A. M., Abdelhameed A. S., Khalil N.Y., Khan A. A., Darwish I. A. (2014) HPLC method with monolithic column for simultaneous determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in tablets. *Acta Pharmaceutica*, 64, 187-198. [\[CrossRef\]](#)
23. Nalini C. N., Mathivanan N. (2020) A review on analytical methods of irbesartan and its combinations in pharmaceutical dosage forms. *Current Pharmaceutical Analysis*, 16(8), 1020-1029. [\[CrossRef\]](#)



VALIDATION STUDY OF A SPECTROPHOTOMETRIC BINARY MIXTURE ANALYSIS

BİR SPEKTROFOTOMETRİK İKİLİ KARIŞIM ANALİZİNİN DOĞRULAMA ÇALIŞMASI

Özgür ÜSTÜNDAĞ^{1*} , Erdal DİNÇ¹ 

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

ABSTRACT

Objective: A rapid spectrophotometric analysis by applying a signal processing method was validated by intra-day and inter-day experiments, standard addition technique, recovery study and analysis of variance (ANOVA). For this purpose, a binary pharmaceutical formulation was evaluated consisting of candesartan cilexetil (CC) and hydrochlorothiazide (HT).

Material and Method: The absorption spectra of mixtures and tablet solutions in the spectral range 200-305 nm were measured by a Shimadzu UV-1601 dual-beam UV-VIS spectrophotometer with a constant gap width (2 nm).

Result and Discussion: Intra-day and inter-day experiments, standard addition technique, recovery study and analysis of variance (ANOVA) studies were carried out by using artificial mixtures were prepared for this purpose. These studies have shown that the validity and applicability of the method is good.

Keywords: Binary mixture, quantitative determination, signal processing, validation

ÖZ

Amaç: Bir sinyal işleme yöntemi uygulanarak hızlı bir spektrofotometrik analiz, gün içi ve günler arası deneyler, standart ekleme tekniği, geri kazanım çalışması ve varyans analizi (ANOVA) ile doğrulanmıştır. Bu amaçla, kandesartan sileksetil (CC) ve hidroklorotiyazidden (HT) oluşan ikili bir farmasötik formülasyon değerlendirildi.

Gereç ve Yöntem: 200-305 nm spektral aralığındaki karışımların ve tablet çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları, sabit bir boşluk genişliğine (2 nm) sahip bir Shimadzu UV-1601 çift ışınlı UV-VIS spektrofotometresi ile ölçülmüştür.

Sonuç ve Tartışma: Gün içi ve günler arası deneyler, standart ekleme tekniği, geri kazanım çalışması ve varyans analizi (ANOVA) çalışmaları yapılmış ve bu amaçla yapay karışımlar hazırlanmıştır. Bu çalışmalar yöntemin geçerliliğinin ve uygulanabilirliğinin iyi olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: İkili karışım, kantitatif tayin, sinyal işleme, validasyon

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Özgür Üstündağ
e-mail / e-posta: ustundag@pharmacy.ankara.edu.tr, **Phone / Tel.:** +903122033171

INTRODUCTION

Modern analytical methods are important for in clinical, biomedical, pharmaceutical analysis, industrial manufacturing quality control, environmental monitoring and forensic medicine. To this end, analytical chemists seek to meet the needs of better chemical measurements or to evolve more efficient procedures and increase the reliability of existing analytical methods to achieve the desired analytical results in many disciplines and the aforementioned fields. [1-3].

Analytical methods such as spectrophotometry [4], mass-spectrometry [5], chromatography [6] and electrophoresis [7], electrochemistry [8] and their joint devices have been used for analytical purposes. Mainly, LC and CE methods have been used in conjunction with different spectroscopic systems (separate techniques, namely LC-MS and CE-MS) to obtain more chemical data and reduce the complication of multicomponent substance analysis. Furthermore, these combined unit methods involve high costs and time for analysis [9-11]. Herewith the disadvantages of the mentioned separation techniques or combination analyzers, analytical chemists opt to use spectroscopic methods (rather than separation techniques) to enable rapid analysis at low cost when success is possible. In particular, derived spectrophotometry and its modified versions have been widely used for rapid quantitative separation of multicomponent mixtures without separation steps. In any case, these spectral methods cannot lead to good analysis because of strongly overlapping composite spectra, noise peaks at the main peaks, fundamental problems, reduced signal intensity and deterioration of the ratio of signal/noise (S/N) for higher orders [12]. Current progresses in signal processing methods have given us more opportunities to find preferable solutions for complex analytical problems [13, 14]. One of the latest introductions is the derived spectrophotometry (DS) application for spectral assay of components in preparations [15]. Several analytical methods for the analysis of CC and HT have been reported in pharmaceutical and biological studies, including derived spectrophotometric methods [16-19] and high performance liquid chromatography methods [20-22].

MATERIAL AND METHOD

The absorption spectra of mixtures and tablet solutions in the spectral range 200-305 nm were measured by a Shimadzu UV-1601 dual-beam UV-VIS spectrophotometer with a constant gap width (2 nm). When applying the methods, Microsoft EXCEL and Wavelet Toolbox in Matlab 7.0 software were applied for calculations.

Commercial Tablet Product

A pharmaceutical tablet (ATACAND PLUS® Tablet, AstraZeneca Pharm. Ind., Istanbul, Turkey) including 16 mg CC and 12.5 mg HT per tablet was gathered from the Turkish market. CC and HT pure compounds were given away by National Pharm. Ind. Company, Turkey.

Standard Solutions

Standard CC and HT stock solutions were arranged respectively by dissolving 25 mg of each drug in 100 mL of methanol. A calibration range between 2.0-20.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for CC and HT in the above solvent was prepared for spectrum analysis from standard stock solutions for each active ingredient. For the standard addition method, sample solutions were arranged by adding the stock solution of each component to the tablets with three different collection rates for the six replicas to appraise the effect of the excipients in the analysis. Moreover, six synthetic sample solutions were prepared in three different sampling stages for analysis during the day and between days.

Sample Solutions Preparation

For testing tablets; twenty tablets of CC and HT were weighed and crushed to a fine powder. Transfer an equal amount of powder to a 100 ml volumetric flask and solved with methanol. The contents of the flask were mechanically stirred for 30 minutes. After filtration, the supernatant was diluted with methanol to an ultimate concentration. This sample preparation was repeated ten times.

RESULT AND DISCUSSION

The purpose of this work is to validate a rapid derivative spectrophotometric method (DS) for the simultaneous assay of CC and HT in mixtures and preparations. The CC and HT standards and the UV spectra of the tablet solution were measured between 200 and 305 nm as can be seen in Figure 1.

First-Derivative Spectrophotometry (DS)

In the application of this method, the first derivative spectra were obtained by using a $\Delta\lambda=10$ nm interval to calculate the derivative data of the original spectra of samples (Figure 2). The calibration graph, which was obtained by measuring the $dA/d\lambda$ values at 263.4 nm for CC and 249.6 nm for HT were used for the analysis. Regression equation, correlation coefficient and their statistical data were shown in Table 1. The calibration equation of the DS method was validated by using the quantitative assay of artificial mixtures. Recovery results and with relative standard deviation were shown in Table 2. The DS was applied to strongly overlapping spectra in the wavelength range 200.0 to 305.0 nm and the resulting spectrum is also shown in Figure 2.

The outcome of the regression analysis obtained are shown in Table 1. The amounts of CC and HT in the samples were computed using the calibration equations obtained from the linear regression analysis in Table 1.

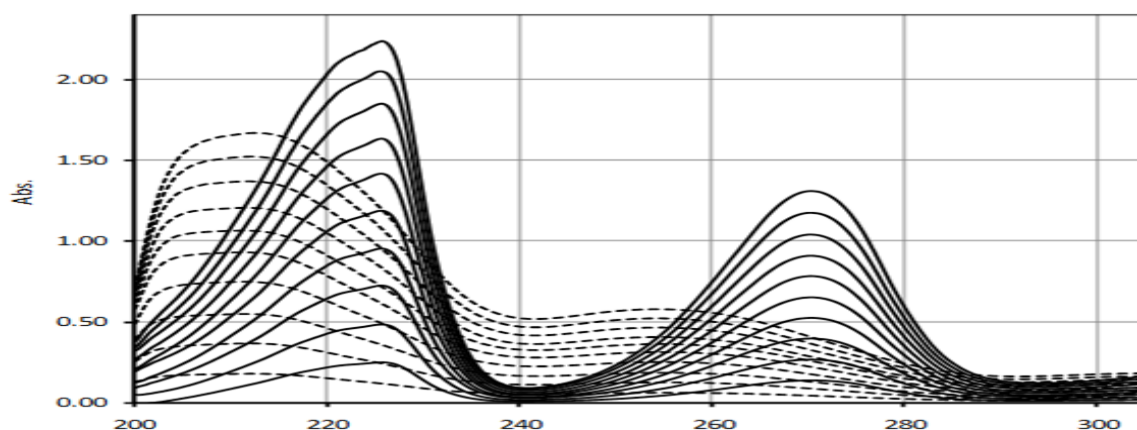


Figure 1. The UV-Absorption spectra of 2.0-20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CC (---) and HT (—) in methanol

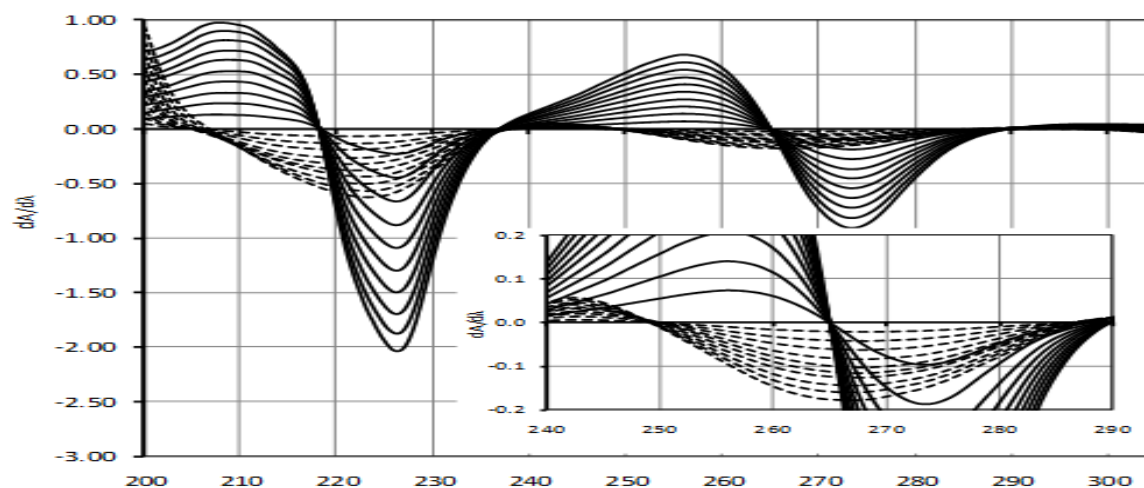


Figure 2. DS of CC (---) (2.0-20.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and HT (—) (2.0-20.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in methanol ($\Delta\lambda=10$ nm)

Table 1. Statistical outcome for the DS method

Method Parameter	DS	
	CC	HT
λ (nm)	264.3	249.6
m	-0.0081	0.0249
n	-0.0121	0.0024
r	0.9989	0.9999
SE(m)	1.56×10^{-4}	1.22×10^{-3}
SE(n)	2.93×10^{-4}	9.82×10^{-5}
SE(r)	2.83×10^{-3}	1.78×10^{-3}
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.34	0.46
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1.15	1.55

Validation of the Proposed Methods

A validation kit consisting of 16 artificial solutions of dissimilar concentrations in methanol in a working range of 2.0-20.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for CC and HT was produced. This validation set tested the accuracy

and precision of the DS method. The results gathered by performing the DS method to artificial mixtures prepared as a verification set are shown in Table 2.

Table 2. Recovery outcome calculated by using artificial mixtures

DS			
Found ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Recovery (%)	
CC	HT	CC	HT
1.91	6.25	95.3	104.1
3.87	6.26	96.7	104.3
5.68	6.35	94.7	105.8
7.45	6.26	93.1	104.3
9.84	6.20	98.4	103.3
12.10	6.15	100.8	102.4
13.99	6.19	100.0	103.2
15.84	6.06	99.0	101.0
17.70	5.99	98.3	99.8
19.64	6.04	98.2	100.7
7.75	2.00	96.9	100.1
8.39	4.14	104.9	103.5
7.62	6.19	95.3	103.1
7.73	8.40	96.6	105.1
7.55	10.40	94.4	104.0
7.64	12.45	95.4	103.8
	Mean	97.1	103.1
	SD	2.70	1.58
	RSD	2.78	1.53

To appraise the accuracy and precision of the DS method, precision and accuracy survey were applied daily at three dissimilar concentrations (2.0, 8.0 and 16.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for CC, HT) during the calibration of the DS method. Thus, 6 dissimilar solutions were used and the prepared solutions were used for intra-day and inter-day studies. The results can be seen in Table 3.

Before the DS method was implemented to the commercial tablet preparation, a standard addition technique was used to test the interference effects of tablet excipients on CC and HT. The results can be seen in Table 4.

Recovery and other calculations for CC and HT were performed by subtracting the quantity of CC and HT from the tablets. These curves were performed with five replicas at three dissimilar concentration grades.

Variance Analysis (ANOVA)

For comparison purposes, ANOVA test was performed for the results obtained from 6 different samples for each concentration in order to statistically evaluate the accuracy and precision of the analysis results obtained intra-day and inter-day with the DS method. It was determined that (with % 95 of confidential limit) there was no significant difference between the analysis results obtained (Table 5).

Table 3. Intra-day and inter-day outcome by the DS method

Intra-day Results						
	Added ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Found ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	SD	RSD	RE	Recovery (%)
CC	2	1.97	0.05	2.60	-1.06	98.3
	8	7.80	0.19	2.48	-1.01	97.5
	16	15.87	0.13	0.81	-0.33	99.2
HT	2	2.04	0.04	1.77	0.72	101.9
	8	8.10	0.17	2.15	0.88	101.3
	16	16.02	0.14	0.85	0.35	100.1
Inter-day Results						
CC	2	1.98	0.04	1.87	-0.76	98.8
	8	7.76	0.17	2.18	-0.89	97.0
	16	15.85	0.19	1.22	-0.50	99.0
HT	2	2.04	0.06	2.89	1.18	101.9
	8	8.19	0.23	2.80	1.14	102.3
	16	16.03	0.16	0.97	0.40	100.2

Table 4. Standard addition outcome by the DS method

No.	CC			HT		
	Added ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	3	7	12	3	6	10
No.	Found ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
1	2.95	7.07	12.38	3.10	6.01	10.22
2	2.93	6.83	12.34	2.99	6.24	10.20
3	2.89	7.33	12.40	2.88	6.00	9.87
4	2.99	7.08	12.36	3.00	6.20	10.46
5	2.89	6.92	12.31	2.98	5.89	10.20
No.	Recovery (%)					
No.	CC			HT		
1	98.4	101.1	103.1	103.4	100.2	102.2
2	97.8	97.6	102.8	99.7	103.9	102.0
3	96.4	104.8	103.3	96.0	100.0	98.7
4	99.8	101.1	103.0	100.1	103.3	104.6
5	96.5	98.9	102.6	99.3	98.1	102.0
Mean	97.8	100.7	103.0	99.7	101.1	101.9
SD	1.42	2.73	0.28	2.62	2.42	2.11
RSD	1.45	2.71	0.27	2.63	2.40	2.07
RE	-2.23	0.68	2.99	-0.29	1.12	1.91

Tablet Analysis

The outcomes gathered by applying the proposed technique to the CC-HT commercial preparation solutions are shown in Table 6. Accomplished results have been gathered for the quantitative determination of tablets containing CC and HT. In the determination of tablets, no interference with the tablet excipients in the determination of the concerned compounds was monitored when the DS method was applied to commercially available tablets.

In a brief conclusion, a rapid approach, DS, was applied to the simultaneous spectral quantification of CC and HT in their artificial mixtures and tablets. It was performed with analytical validation parameters to indicate the validity and applicability of the method.

Table 5. Results of ANOVA test

Compound	Source of Variation	SS	df	MS	F-calculated	P-value	F-crit
CC	Between groups	36.86	5	7.37	1.10	0.38	2.53
	Within groups	200.45	30	6.68			
	Total	237.31	35				
HT	Between groups	26.48	5	5.30	1.20	0.33	2.53
	Within groups	132.71	30	4.42			
	Total	159.20	35				

Table 6. Tablet assay by the DS method

Method	DS	
	CC (mg)	HT (mg)
Mean	15.80	12.76
SD	0.13	0.22
RSD	0.82	1.71
SE	0.04	0.07
CL	0.08	0.14

16.0 mg of CC and 12.5mg of HT per tablet

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception: Ö.Ü., E.D.; Design: Ö.Ü.; Supervision: Ö.Ü.; Resources: Ö.Ü., E.D.; Materials: Ö.Ü., E.D.; Data collection and/or processing: Ö.Ü.; Analysis and/or interpretation: Ö.Ü., E.D.; Literature search: Ö.Ü.; Writing manuscript: Ö.Ü., E.D.; Critical review: Ö.Ü.; Other: Ö.Ü., E.D.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Siddiqui, M.R., Alothman, Z.A., Rahman, N. (2017). Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, 1409-1421. [CrossRef]

2. Valagaleti, R., Burns, P.K., Gill, M. (2003). Analytical support for drug manufacturing in the United States—from active pharmaceutical ingredient synthesis to drug product shelf life. *Drug Information Journal*, 37, 407-438. [\[CrossRef\]](#)
3. Ju, H. (2013). Grand challenges in analytical chemistry: towards more bright eyes for scientific research, social events and human health. *Frontiers in Chemistry*, 1, 5. [\[CrossRef\]](#)
4. El-Didamony, A.M., Saad, M.Z., Saleem, N.O. (2015). Spectrophotometric determination of some analgesic drugs in pharmaceutical formulations using N-bromosuccinimide as an oxidant. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*, 17, 43-50. [\[CrossRef\]](#)
5. Baghel, U.S., Singh, A., Singh, D., Sinha, M. (2017). Application of mass spectroscopy in pharmaceutical and biomedical analysis. *Spectroscopic Analyses-Developments and Applications*, IntechOpen book series, London. [\[CrossRef\]](#)
6. Khateeb, L.A., Al-Hakami, W.E. (2020). Reliable chromatographic determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in real samples matrices. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. [\[CrossRef\]](#)
7. Baciu, T., Botello, I., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C. (2015). Capillary electrophoresis and related techniques in the determination of drugs of abuse and their metabolites. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 74, 89-108. [\[CrossRef\]](#)
8. Özdokur, K.V. (2020). Voltammetric determination of isoniazid drug in various matrix by using CuOx decorated mw-cnt modified glassy carbon electrode. *Electroanalysis*, 32, 489-495. [\[CrossRef\]](#)
9. Chhonker, Y.S., Edi, C., Murry, D.J. (2018). LC–MS/MS method for simultaneous determination of diethylcarbamazine, albendazole and albendazole metabolites in human plasma: Application to a clinical pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 151, 84–90. [\[CrossRef\]](#)
10. Sáiz, J., García-Ruiz, C., Gómara, B. (2017). Comparison of different GC-MS configurations for the determination of prevalent drugs and related metabolites. *Analytical Methods*, 9, 2897-2908. [\[CrossRef\]](#)
11. Maurer, H.H. (1995). Toxicological Analysis of Drugs: GC-MS Screening and Confirmation. In: P. Mangin and B. Ludes (Eds.), *Acta Medicinæ Legalis*, (pp 489-492). Springer, Berlin, Heidelberg. [\[CrossRef\]](#)
12. Daubechies, I. (1992). Ten Lectures on Wavelets, Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, p.357. [\[CrossRef\]](#)
13. Dinç, E., Baleanu, D. (2007). Continuous wavelet transform applied to the overlapping absorption signals and their ratio signals for the quantitative resolution of mixture of oxfendazole and oxcyclozanide in bolus. *Journal of Food and Drug Analysis*, 15(2), 109-117. [\[CrossRef\]](#)
14. Dinç, E., Baleanu, D., Üstündağ, Ö. (2003). An approach to quantitative two-component analysis of a mixture containing hydrochlorothiazide and spironolactone in tablets by one dimensional continuous daubechies and biorthogonal wavelet analysis of UV-spectra. *Spectroscopy Letters*, 36, 341-355. [\[CrossRef\]](#)

15. Redasani, V.K., Patel, P.R., Marathe, D.Y., Chaudhari, S.R., Shirkhedkar, A.A., Surana, S.J. (2018). A review on derivative UV-spectrophotometry analysis of drugs in pharmaceutical formulations and biological samples review. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 63(3), 4126-4134. [\[CrossRef\]](#)
16. Charoo, N.A., Bashir, M., Abdalla, E., Ali, K.I.H. (2009). Determination of candesartan cilexetil in tablet dosage forms and dissolution testing samples by first derivative UV spectrophotometric methods. *Analytical Letters*, 42(14), 2232-2243. [\[CrossRef\]](#)
17. Belal, T.S., Daabeesb, H.G., Abdel-Khalekb, M.M., Mahrousb, M.S., Khamisb, M.M. (2013). New simple spectrophotometric method for determination of the binary mixtures (atorvastatin calcium and ezetimibe; candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide) in tablets. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3(2), 118-126. [\[CrossRef\]](#)
18. Gangola, R., Kaushik, S., Sharma, P. (2011). Spectrophotometric simultaneous determination of hydrochlorothiazide and telmisartan in combined dosage form. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(1), 46-49. [\[CrossRef\]](#)
19. Erk, N. (2003). Application of first derivative UV-spectrophotometry and ratio derivative spectrophotometry for the simultaneous determination first derivative UV-spectrophotometry and ratio derivative spectrophotometry. *Pharmazie*, 11, 2580-2590. [\[CrossRef\]](#)
20. Khedr, A.E. (2008). Simultaneous determination of candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide by high-performance liquid chromatography. *Journal of King Abdulaziz University*, 15(2), 3-13. [\[CrossRef\]](#)
21. Bonthu, M.G., Atmakuri, L.R., Jangala, V.R. (2018). Simultaneous determination of candesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by LC-MS/MS. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(1):17381. [\[CrossRef\]](#)
22. Annapurna, M.M., Venkatesh, B., Chaitanya, R.K. (2017). Quality by design approach (QbD) for the simultaneous determination of anti-hypertensive drugs (candesartan, irbesartan and hydrochlorothiazide) by RP-HPLC. *Journal of Analytical&Pharmaceutical Research*, 4(5), 00118. [\[CrossRef\]](#)



ANTIOXIDANT, ANTIMICROBIAL AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITIES OF *GALIUM APARINE*

GALIUM APARINE 'NİN ANTIÖKSİDAN, ANTİMİKROBİYAL VE ANTİPROLİFERATİF
AKTİVİTELERİ

Nuh KORKMAZ^{1,*} , Alpaslan DAYANGAÇ² , Mustafa SEVİNDİK³ 

¹Osmaniye Korkut Ata University, Science and Literature Faculty, Department of Biology, 80000,
Osmaniye, Turkey

²Osmaniye Korkut Ata University, Faculty of Health Sciences Department of Nutrition and Dietics,
80000, Osmaniye, Turkey

³Osmaniye Korkut Ata University, Bahçe Vocational School, Department of Food Processing, 80500,
Osmaniye, Turkey

ABSTRACT

Objective: Plants are known to have many biological activities. In this study, the antioxidant, oxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of *Galium aparine* L. were investigated.

Material and Method: The antioxidant and oxidant potentials of the plant, the aerial parts of which were extracted with ethanol in a Soxhlet device, were measured using Rel assay kits. Antimicrobial activity against bacteria and fungi was determined using the agar dilution method. Lung carcinoma cell line (A549) was used to determine the antiproliferative activity.

Result and Discussion: As a result of the studies, total antioxidant status (TAS) value of plant extracts was determined as 5.147 ± 0.237 , total oxidant status (TOS) value as 18.679 ± 0.245 and oxidative stress index (OSI) value as 0.346 ± 0.018 . Plant extracts were found to be effective against test microorganisms at concentrations of 50-200 $\mu\text{g/mL}$. In addition, it was determined that the antiproliferative activity of the plant extract showed potent effects depending on the increase in the extract concentration. Finally, it was determined that *Galium aparine* has high biological activity and can be used as a natural pharmacological agent in this context.

Keywords: *Galium aparine*, medicinal plants, antioxidant, antiproliferative

ÖZ

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Nuh Korkmaz
e-mail / e-posta: korkmazhun@gmail.com, **Phone / Tel:** +905050227978

Amaç: Bitkilerin birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada *Galium aparine* L.'nin antioksidan, oksidan, antimikrobiyal ve antiproliferatif aktiviteleri araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Toprak üstü kısımları Soxhlet cihazında etanol ile ekstrakte edilen bitkinin antioksidan ve oksidan potansiyelleri Rel test kitleri kullanılarak ölçüldü. Bakteri ve mantarlara karşı antimikrobiyal aktivite, agar seyreltme yöntemi kullanılarak belirlendi. Antiproliferatif aktiviteyi belirlemek için Lung Carcinoma Cell Line (A549) kullanıldı.

Sonuç ve Tartışma: Çalışmalar sonucunda bitki ekstraktlarının toplam antioksidan seviyesi (TAS) değeri 5.147 ± 0.237 , toplam oksidan seviyesi (TOS) değeri 18.679 ± 0.245 ve oksidatif stres indeksi (OSI) değeri 0.346 ± 0.018 olarak belirlenmiştir. Bitki ekstraktlarının 50-200 µg/mL konsantrasyonlarında test mikroorganizmalarına karşı etkili olduğu bulundu. Ayrıca bitki ekstraktının antiproliferatif aktivitesinin ekstrakt konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak güçlü etkiler gösterdiği belirlendi. Sonuç olarak *Galium aparine*'nin yüksek biyolojik aktiviteye sahip olduğu ve bu bağlamda doğal bir farmakolojik ajan olarak kullanılabileceği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Galium aparine*, tıbbi bitkiler, antioksidan, antiproliferatif

INTRODUCTION

The use of herbs in alternative medicine for different purposes goes back to ancient times. Plants are natural resources that contain compounds that have many different biological effects. These compounds have been found to have many different effects such as antibacterial, antiviral, antioxidant, antimutagenic, anticarcinogenic, antidepressant and anti tumor. Therefore, it has been stated that those who regularly consume herbs suffer less from cancer and cardiological disorders [1, 2].

Galium aparine L.(Rubiaceae), which is common in temperate regions, is a climbing plant native to Asia, Europe, and North America [3]. *G. aparine*, which draws attention with its detrimental effect on potential yield, is an undesirable plant species in cereal, rapeseed and sugar beet fields [4]. However, it has traditionally been used in numerous medical applications for a variety of health conditions. All plant parts (stem, leaves, flowers and seeds) have been used in fever and urinary tract infections, eczema or skin diseases, ulcers, chronic wounds. It has also been used to reduce swelling, infection, and inflammation, increase lymphatic flow, and stop bleeding [5]. It is also used as a local tea by boiling the herb. According to some reports, the active ingredients of *G. aparine* are flavonoids, polyphenolic acids, tannins, anthraquinones, iridoids, alkanes, fatty acids, aromatic compounds, chlorophylls, carotenoids, iridoids, sesquiterpenoids, squalene, polyphenol, phytosterols and vitamin C. These active ingredients contribute to the intake of natural antioxidants [6-12]. Researchers reported that *G. aparine* was used in the treatment of cancer, fever, leukemia, jaundice, lymph swelling, tonsillitis, wounds, scurvy and hypertension [13]. Also, roasted seeds of *G. aparine* were used as a coffee substitute in Sweden [4]. Roasted young shoots are eaten [14] and used to coagulate milk in Turkey, being known as “yogurt herb” [7,8]. Although it has a long history in phytotherapy and is used as a diuretic by modern herbalists, there are few pharmacological studies to support this efficacy.

Oxidation provides energy to the organism for vital activities. There is a balance between the amount of free radicals produced in the organism and the antiradicals that protect and remove the body from their harmful effects [15]. Free radicals, including hydrogen peroxide, superoxide anions and

hydroxyl radicals, play an important role in oxidative damage at the cellular level. Studies show that biochemical changes induced by reactive oxygen species (ROS) are determinants of various diseases such as diabetes mellitus, atherosclerosis, cancer, arthritis, inflammation and neurodegeneration [16]. The human body has developed many mechanisms, both enzymatic and non-enzymatic, to inactivate ROS, but these may not be sufficient to struggle severe oxidative stress conditions. Many studies have been carried out to prevent oxidative stress diseases. The most studied subjects in the fight against oxidative stress are to reduce the effect of oxidative stress on the body by providing more natural antioxidants that can be obtained by increasing the use of vegetables and fruits. Natural antioxidants are safe and also exhibit biological and pharmacological activities. Therefore, extensive studies have been carried out recently to identify herbs with antiradical ability that humans can consume [17].

Plants such as medicinal, aromatic and spice plants contain a wide variety of free radical scavenging molecules with antioxidant properties. For this reason, medicinal and aromatic plants have been evaluated as an alternative treatment method in recent years and studies in this field have been increasing. Most of the herbal extracts have antioxidant properties that prevent oxidative stress. Natural antioxidants that increase the power of antioxidants in plasma reduce the incidence of certain diseases such as heart disease, cancer and stroke. The aim of our study is to determine the antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of *Galium aparine* L. plant collected in Gaziantep, Turkey.

MATERIAL AND METHOD

Plant Material and Extraction

The plant samples of *G. aparine* were collected in Gaziantep province. After aerial parts were reduced to powder. 30 gr of dry samples were weighed and extracted with EtOH at 50 °C for approximately 6 hours (Gerhardt EV 14). The extracts obtained are concentrated with a rotary evaporator (Heidolph Laborota 4000 Rotary Evaporator).

Antioxidant, Oxidant and Oxidative Stress Index Tests

The total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS) and oxidative stress index (OSI) of the plant extracts we used in our study were determined using Rel Assay Kits (Rel Assay Kit Diagnostics, Turkey). TAS value was expressed as mmol Trolox equiv./L and Trolox was used as the calibrator [18]. The TOS value was expressed as $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv./L and hydrogen peroxide was used as the calibrator [19]. The OSI (Arbitrary Unit) was calculated with the formula below [20].

$$\text{OSI (AU)} = \frac{\text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equiv./L})}{\text{TAS (mmol Trolox equiv./L)} \times 10}$$

Antimicrobial Activity

The most recognized standards are provided by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Antimicrobial activity tests of plant EtOH extracts were performed using the agar dilution method recommended by CLSI and EUCAST. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of the extract against standard bacterial and fungal strains were determined. The following microorganisms were used for this purpose: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 were used as gram-negative bacteria. Furthermore, *Candida albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 34135 and *C. glabrata* ATCC 90030 were used as fungi and were obtained from the American culture collection. Bacteria strains were pre-cultured in Muller Hinton Broth medium and fungal strains were pre-cultured in RPMI 1640 Broth medium. To obtain standard inoculum, the turbidity of the bacteria and fungi was set based on the McFarland 0.5 scale. All extracts were tested at 800-12.5 µg/mL concentrations and distilled water was used in all dilutions. Solvents used in the extracts were individually tested for antimicrobial activity. Amphotericin B and Fluconazole were used as reference drugs against fungi. Amikacin, Ampicillin and Ciprofloxacin were used as reference drugs for bacteria. The lowest concentration that inhibits the growth of fungi and bacteria was determined as the minimum inhibitory concentration (MIC) [21-26].

Determination of Antiproliferative Effects

The MTT assay (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) was conducted on the Lung Carcinoma Cell Line (A549) of the EtOH extract obtained from plant samples to determine cell viability. Cells were separated with 3.0 mL Trypsin-EDTA solution (Sigma-Aldrich, MO, USA) after 70-80% coalescence. The product was cultured in plates after separation and incubated for 24 hours. Then the extracts were diluted at different concentrations (25, 50, 100, 200 µg/mL) and the cells were incubated for 24 hours. Controls were administered in growth medium not supplemented with fetal calf serum (FCS). After 48 hours of incubation, the supernatants were dissolved in growth medium and replaced with 1 mg/mL MTT (Sigma) and incubated at 37°C until purple precipitate formed. The extracted supernatants were then solubilized by adding dimethyl sulfoxide (DMSO) to MTT (Sigma-Aldrich, MO, USA) absorbed by the cells. Plates were then read at 570 nm with an Epoch spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooska, VT) [27].

RESULT AND DISCUSSION

Antioxidant and Oxidant Status

In recent years, there has been an increasing interest among researchers towards antimicrobial

compounds and antioxidants that are natural and safe to use. Numerous herbs and spices are described as sources of antioxidants and antimicrobial substances. In recent studies, it has been reported that polyphenols in diet and herbal products prevent oxidative stress. The preventive ingredients of these foods are especially anthocyanins, polyphenols and flavonoids. An antioxidant compound is a substance that at low concentrations delays or prevents oxidation of a substrate. Living organisms produce reactive oxygen species as a result of environmental influences and metabolic activities. ROS produced at high levels can be harmful to living organisms. Antioxidant compounds suppress the negative effects of ROS. Oxidative stress occurs when antioxidant compounds are insufficient. Parkinson's, Alzheimer's, cancer or cardiological disorders occur in humans as a result of oxidative stress. Complementary antioxidants can be used to reduce the effects of oxidative stress [28- 30]. In this study, the antioxidant and oxidant potential of *G. aparine* was determined. The findings obtained are shown in Table 1.

Table 1. TAS, TOS and OSI Values of *Galium aparine*

	TAS (mmol/L)	TOS (μ mol/L)	OSI
<i>G. aparine</i>	5.147 \pm 0.237	18.679 \pm 0.245	0.346 \pm 0.018

* Values are presented as mean \pm S.D.

TAS, TOS and OSI values of *G. aparine* were determined for the first time in this study. In studies conducted on different plant species, the TAS value of *Rhus coriaria* var. *zebaria* was reported as 7.342, TOS value 5.170 and OSI value 0.071 [31]. TAS value of *Mentha longifolia* subsp. *longifolia* was reported as 3.628, TOS value as 4.046 and OSI value as 0.112[32]. The TAS value of *Calendula officinalis* was reported as 5.55 [33]. The TAS value of *Allium calocephalum* has been reported as 5.853, the TOS value as 16.288 and the OSI value as 0.278 [34]. TAS value of *Scorzonera papposa* has been reported as 5.314, TOS value as 24.199 and OSI value as 0.456 [35]. The TAS value of *Ferulago platycarpa* was reported to be 5.688, TOS value 15.552 and OSI value 0.273 [36]. TAS value of *Thymbra spicata* was 8.399, TOS value was 6.530 and OSI value was 0.078 [37]. TAS value of *Gundelia tournefortii* was reported as 6.831, TOS value as 3.712 and OSI value as 0.054 [38]. The TAS value of *Rumex crispus* was reported as 6.758, TOS value as 5.802 and OSI value as 0.086 [39]. Compared to these studies, the TAS value of *G. aparine* was higher than *Mentha longifolia* subsp. *longifolia*, and lower than *Rhus coriaria* var. *zebaria*, *Calendula officinalis*, *Allium calocephalum*, *Scorzonera papposa*, *Ferulago platycarpa*, *Thymbra spicata*, *Gundelia tournefortii* and *Rumex crispus*. TAS value shows the whole of antioxidant effective compounds produced in the body of the organism. In this context, the higher TAS value, the higher antioxidant property of the plant. As a result, it was determined that *G. aparine* has significant antioxidant activity.

TOS value shows the whole of oxidant compounds produced as a result of environmental effects and metabolic activities in living organisms. As the TOS value increases, the oxidative stress of the plant

increases. OSI value shows how much oxidant compounds produced by environmental effects in living organisms are suppressed by endogenous antioxidants. As the OSI value increases, plant oxidant compounds are insufficient to suppress and oxidative stress occurs.

The TOS and OSI values of *G. aparine* were higher than *Rhuscoriaria* var. *zebaria*, *Menthalongifolia* subsp. *longifolia*, *Allium calocephalum*, *Ferulago platycarpa*, *Thymbra spicata*, *Gundelia tournefortii* and *Rumex crispus*, and lower than *Scorzoner apapposa*. In this context, it is seen that *G. aparine* is at high levels in terms of oxidant compound. In addition, it was determined that the oxidative stress levels of *G. aparine* were at normal levels.

In previous studies, the antioxidant activities of methanol extract of *G. aparine* and its n-hexane, ethyl acetate, butanol and aqueous extracts were examined in vitro. Studies revealed that all fractions exhibited remarkable antioxidant activity, but clearly demonstrated that the aqueous fraction of *G. aparine* strongly scavenged DPPH, ABTS, hydroxyl, hydrogen peroxide and superoxide radicals [6, 8]. In our study, it was determined that EtOH extract of *G. aparine* has antioxidant activity using Rel Assay kits. As a result, it was determined that *G. aparine* has significant antioxidant activity.

Antimicrobial Activity

Living organisms interact with many microorganisms depending on their environmental conditions. In their natural environment, they provide resistance against microorganisms with the secondary metabolites they produce as a result of this interaction. In this context, these natural products can be used by humans as an antimicrobial source. In our study, the effects of *G. aparine* against standard bacteria and fungi were investigated. The results obtained are shown in Table 2.

Table 2. Antimicrobial Activity of *G. aparine*

	A	B	C	D	E	F	G	H	J
<i>G.aparine</i>	100	100	200	100	200	100	50	50	50

The MIC values are presented in units of $\mu\text{g/mL}$

A: *S. aureus*, B: *S. aureus* MRSA, C: *E. faecalis*, D: *E. coli*, E: *P. aeruginosa*, F: *A. baumannii*, G: *C. albicans*, H: *C. glabrata*, I: *C. krusei*

*200, 100, 50 and 25 $\mu\text{g/mL}$ extract concentrations

In previous studies, it was reported that hydromethanolic extract of *Galium aparine* has antimicrobial activity against *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus flavus*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus ochraceus*, *A. niger*, *Candida krusei*, *Penicillium funiculosum*, *P. ochrochloron* and *P. verrucosum* var. *cyclopium* [40].

It has been reported that analysis of ethanol and chloroform extracts of *Galium verum* L., *Galium salicifolium* Klokov, *Galium dasypodum* Klokov, *Galium aparine* L, *Galium carpaticum* Klokov and *Galium pseudomollugo* Klokov are effective at different concentrations against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida*

albicans [41]. It has been reported that chloroform, methanol and hexane extracts of *Galium mexicanum* have antimicrobial activity against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Trichophyton rubrum* [42]. In our study, it was determined that EtOH extract of *Galium aparine* was effective against *S. aureus*, *S. aureus* MRSA, *E. coli* and *A. baumannii* at concentrations of 100 µg/mL, *E. faecalis* and *P. aeruginosa* at 200 µg/mL, *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei* at 50 µg/mL. The result of the study showed that *Galium aparine* EtOH extract is more effective against fungal strains. Finally, it was determined that plant extracts can be an important natural resource in preventing the growth of microorganisms.

Antiproliferative activity

In parallel with the history of humanity, plants have been used by all cultures due to their health-supporting and disease-curing properties. It is estimated that approximately 80-85% of the human population trust on traditional medicine. A large part of traditional treatment goes through the use of herbal extracts. Many studies have reported that plants have anticancer properties. In addition, it has been reported that plants have achieved very important results especially in supportive treatments applied in cancer treatment. In our study, the effects of EtOH extract of *G. aparine* on lung carcinoma cell line (A549) were investigated. The findings obtained are shown in Figure 1.

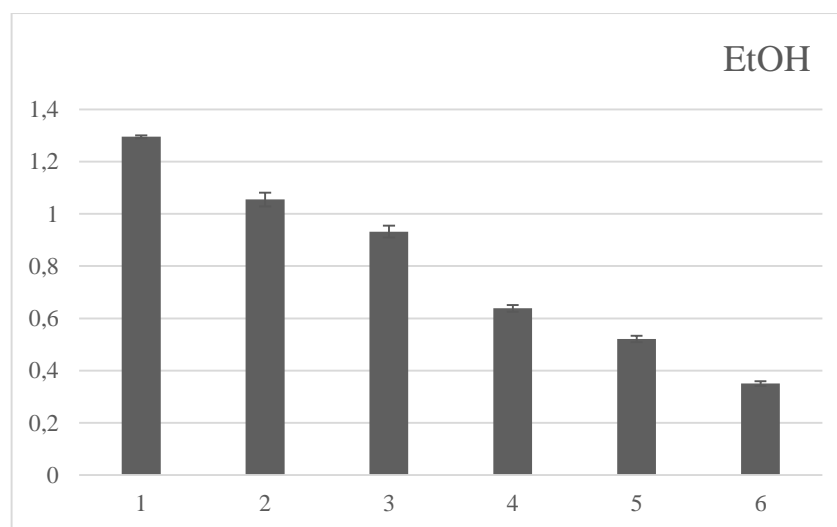


Figure 2. Antiproliferative activity of *Galium aparine*

In our study, it was determined that EtOH extracts of *G. aparine* exhibited strong cytotoxic effects on the A549 cell line depending on the dose increase. In previous studies, it was reported that methanol and ethyl acetate extracts of *G. aparine* were effective against Human breast cancer cells and Human colon cancer cells [10]. In a different study, *G. aparine*'s MeOH extract was reported to have a cytotoxic effect against breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-23 [43]. In this study, A549 cell line was

used and it was determined that it has strong cytotoxic effects. As a result, it was determined that *G. aparine* can be used as an anticarcinogenic.

In conclusion, medicinal plants are used in the treatment of many diseases. The biological activities of the *Galium aparine* plant were determined in our study. As a result of the studies, it was determined that the plant extract has an important antioxidant potential. In addition, it was found that it has antimicrobial activity against microorganisms and especially high antifungal activity. In addition, it was determined that the plant exhibited significant anticancer effect against lung carcinoma cell line. As a result, it was determined that the plant has a high biological activity and can be used as a natural agent in pharmacological studies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: *N.K., A.D., M.S.*; Design: *N.K., A.D., M.S.*; Control: *N.K., A.D., M.S.*; Sources: *F.S.M.*; Materials: *N.K., A.D., M.S.*; Data Collection and/or processing: *N.K., A.D., M.S.*; Analysis and/or interpretation: *N.K., A.D., M.S.*; Literature review: *N.K., A.D., M.S.*; Manuscript writing: *F.S.M., N.K.*; Critical review: *N.K., A.D., M.S.*; Other: *N.K., A.D., M.S.*

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Merken, H.M., Beecher, G.R. (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 577-599. [CrossRef]
2. de Souza, L.M., Cipriani, T.R., Iacomini, M., Gorin, P. A., Sasaki, G.L. (2008). HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(1), 59-67. [CrossRef]
3. CABI, 2018. Invasive Species Compendium. [WWW Document]. URL <https://www.cabi.org/isc/datasheet/24772> (Accessed 2 February 18).
4. Malik, N., Born, W.V. (1988). The biology of Canadian weeds.: 86. *Galium aparine* L. and *Galium spurium* L. *Canadian Journal of Plant Science*, 68(2), 481-499. [CrossRef]
5. Toby, G., Denham, A., Whitelegg, M. (2016). *The Western herbal tradition: 2000 years of medicinal plant knowledge*. Singing Dragon.

6. Bokhari, J., Khan, M.R., Shabbir, M., Rashid, U., Jan, S., Zai, J. A. (2013). Evaluation of diverse antioxidant activities of *Galium aparine*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 102, 24-29. [\[CrossRef\]](#)
7. Deliorman, D., Calis, I., Ergun, F. (2001). Iridoids from *Galium aparine*. *Pharmaceutical Biology*, 39(3), 234-235.
8. Aslantürk, Ö.S., Çelik, T.A., Karabey, B., Karabey, F. (2017). Active Phytochemical Detecting, Antioxidant, Cytotoxic, Apoptotic Activities of Ethyl Acetate and Methanol Extracts of *Galium aparine* L. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 1-16. [\[CrossRef\]](#)
9. Goryacha, O.V., Ilyina, T.V., Kovalyova, A.M., Kashpur, N. V. (2014). Phytochemical research of *Galium aparine* L. lipophilic complex and study of its antibacterial activity.
10. Vlase, L., Mocan, A., Hanganu, D., Benedec, D., Gheldiu, A., Crisan, G. (2014). Comparative study of polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of four Galium species (Rubiaceae). *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 9(3), 1085-1094.
11. Moubasher, H., Abd El-Ghani, M., Al-Wakeel, S., Bahoor, A. (2016). Chemotaxonomic significance of flavonoids in some species of Galium (Rubiaceae) from Libya. *Austin Journal of Plant Biology*, 2(1), 1014.
12. Mocan, A., Crisan, G., Vlase, L., Ivanescu, B., Badarau, A.S., Arsene, A.L. (2016). Phytochemical investigations on four Galium species (Rubiaceae) from Romania. *Farmacia*, 64(1), 95-99.
13. Ahmad, S.S., Javed, S.U.M.A.I.R.A. (2007). Exploring the economic value of underutilized plant species in Ayubia National Park. *Pakistan Journal of Botany*, 39(5), 1435-1442.
14. Taskin, T., Bitis, L. (2016). In vitro antioxidant activity of eight wild edible plants in Bursa province of Turkey. *Medicine*, 6, 25.
15. Shirwaikar, A., Shirwaikar, A., Rajendran, K., Punitha, I.S.R. (2006). In vitro antioxidant studies on the benzyl tetra isoquinoline alkaloid berberine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(9), 1906-1910. [\[CrossRef\]](#)
16. Soni, H., Pandey, H., Phatak, A. K., Nayak, G., Singhai, A. K., Parihar, A., Singh, V., Rathur, A. S. (2009). Evaluation of antioxidant potential of hydro alcoholic extract of leaves of *Coleus aromaticus*. *Advances in Pharmacology and Toxicology*, 10(1), 75-82.
17. Jain, S., Gupta, A., Malviya, N., Suhur, H. (2009). Comparative antioxidant potential screening of polyherbal formulations. *Advances in Pharmacology and Toxicology*, 10(1), 101-110.
18. Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4), 277-285. [\[CrossRef\]](#)
19. Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38(12), 1103-1111. [\[CrossRef\]](#)
20. Sevindik, M. (2019). The novel biological tests on various extracts of *Ceriporus varius*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 28(5), 3713-3717.

21. Bauer, A.W. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 149-158.
22. Hindler, J., Hochstein, L., Howell, A. (1992). Preparation of routine media and reagents used in antimicrobial susceptibility testing. Part 1. McFarland standards, p. 5.19.1-5.19.6. In H. D. Isenberg (ed) *Clinical microbiology procedures handbook*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
23. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, Approved Standard, 9th ed., CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.
24. Matuschek, E., Brown, D.F., Kahlmeter, G. (2014). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection* 20: 255-266. [\[CrossRef\]](#)
25. EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). (2014). Breakpoint tables Fungal isolate for interpretation of MICs. Version 7.0.
26. EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). (2015). Breakpoint tables for Bacteria interpretation of MICs and zone diameters, Version 5.0.
27. Bal, C., Akgul, H., Sevindik, M., Akata, I., Yumrutas, O. (2017). Determination of the antioxidative activities of six mushrooms. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26(10), 6246-6252.
28. Eberhardt, M.V., Lee, C.Y., Liu, R.H. (2000). Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*, 405(6789), 903-904. [\[CrossRef\]](#)
29. Zhao, R., Chen, Z., Jia, G., Li, J., Cai, Y., Shao, X. (2011). Protective effects of diosmetin extracted from *Galium verum* L. on the thymus of U14-bearing mice. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 89(9), 665-673. [\[CrossRef\]](#)
30. Sevindik, M. (2020). Antioxidant and antimicrobial capacity of *Lactifluus rugatus* and its antiproliferative activity on A549 cells. *Indian Journal of Traditional Knowledge (IJTK)*, 19(2), 423-427.
31. Mohammed, F.S., Akgul, H., Sevindik, M., Khaled, B.M.T. (2018). Phenolic content and biological activities of *Rhus coriaria* var. *zebaria*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(8), 5694-5702.
32. Sevindik, M., Akgul, H., Pehlivan, M., Selamoglu, Z. (2017). Determination of therapeutic potential of *Mentha longifolia* ssp. *longifolia*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26(7), 4757-4763.
33. Verma, P.K., Raina, R., Sultana, M., Singh, M., Kumar, P. (2016). Total antioxidant and oxidant status of plasma and renal tissue of cisplatin-induced nephrotoxic rats: protection by floral extracts of *Calendula officinalis* Linn. *Renal Failure*, 38(1), 142-150. [\[CrossRef\]](#)
34. Mohammed, F.S., Karakaş, M., Akgül, H., Sevindik, M. (2019). Medicinal properties of *Allium calocephalum* collected from Gara Mountain (Iraq). *Fresenius Environmental Bulletin*, 28(10), 7419-7426.

35. Mohammed, F.S., Günal, S., Şabik, A.E., Akgül, H., Sevindik, M. (2020). Antioxidant and Antimicrobial activity of *Scorzonera papposa* collected from Iraq and Turkey. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 23(5), 1114-1118. [[CrossRef](#)]
36. Mohammed, F.S., Günal, S., Pehlivan, M., Doğan, M., Sevindik, M., Akgül, H. (2020). Phenolic content, antioxidant and antimicrobial potential of endemic *Ferulago platycarpa*. *Gazi University Journal of Science*, 33(4), 670-677. [[CrossRef](#)]
37. Mohammed, F.S., Şabik, A.E., Sevindik, E., Pehlivan, M., Sevindik, M. (2020). Determination of Antioxidant and Oxidant Potentials of *Thymbra spicata* Collected from Duhok-Iraq. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(5), 1171-1173. [[CrossRef](#)]
38. Saraç, H., Demirbaş, A., Daştan, S.D., Ataş, M., Çevik, Ö., Eruygur, N. (2019). Evaluation of Nutrients and Biological Activities of Kenger (*Gundellia tournefortii* L.) Seeds Cultivated in Sivas Province. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(sp2), 52-58. [[CrossRef](#)]
39. Daştan, S.D., Durukan, H., Demirbaş, A., Dönmez, E. (2019). Bioactivity and Therapeutic Properties of Evelik (*Rumex crispus*), A Naturally Growing and Edible Plant in Sivas Province. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(sp2), 67-71. [[CrossRef](#)]
40. Senio, S., Pereira, C., Vaz, J., Sokovic, M., Barros, L., Ferreira, I.C. (2018). Dehydration process influences the phenolic profile, antioxidant and antimicrobial properties of *Galium aparine* L. *Industrial Crops and Products*, 120, 97-103. [[CrossRef](#)]
41. Ilyina, T.V., Goryacha, O.V., Toryanik, E. L., Kulish, I.A., Kovaleva, A.M. (2016). Antimicrobial Activity of the Genus Galium L.
42. Bolivar, P., Cruz-Paredes, C., Hernández, L. R., Juárez, Z.N., Sánchez-Arreola, E., Av-Gay, Y., Bach, H. (2011). Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 141-147. [[CrossRef](#)]
43. Atmaca, H., Bozkurt, E., Cittan, M., Tepe, H.D. (2016). Effects of *Galium aparine* extract on the cell viability, cell cycle and cell death in breast cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 186, 305-310. [[CrossRef](#)]



MOLECULAR DOCKING STUDIES ON SOME 4,5-DIHYDRO-1H-PYRAZOLE DERIVATIVES AS CYCLOOXYGENASE INHIBITORS

SİKLOOKSİJENAZ İNHİBİTÖRLERİ OLARAK BAZI 4,5-DİHİDRO-1H-PİRAZOL
TÜREVLERİ ÜZERİNDE MOLEKÜLER DOKİNG ÇALIŞMALARI

Begüm EVRANOS AKSÖZ* 

Suleyman Demirel University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, 32000,
Isparta, Turkey

ABSTRACT

Objective: To examine the interactions of some 4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives, which are thought to have antiinflammatory effects, with cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) enzymes, docking studies were carried out on these enzymes.

Material and Method: COX-1 enzyme (3KK6) and COX-2 enzyme (3LN1) were selected from the protein data bank for docking studies. The ligand and protein constructs were prepared using Autodock 1.5.6. AutoDock Vina was used to determining the binding affinity, and Discovery Studio 3.5 was utilised to analyse and display the docking results.

Result and Discussion: As a result of the docking process on COX-1 and COX-2 enzymes, 4,5-Dihydro-1H-pyrazole derivatives were observed to interact with both enzymes. The 4,5-dihydro-1H-pyrazole ring was found to be important in its interactions with the COX-2 enzyme. The inclusion of a bulky group in the construct did not cause any problems in interaction with the COX-1 enzyme but eliminated some interactions with the COX-2 enzyme. To better elucidate the inhibition properties of enzymes, this study should be supported by in vitro and in vivo COX inhibition tests.

Keywords: Cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2, 4,5-dihydro-1H-pyrazole, inflammation, molecular docking

ÖZ

Amaç: Antiinflamatuvar etkileri olduğu düşünülen bazı 4,5-dihidro-1H-pirazol türevlerinin siklooksijenaz 1(COX-1) ve siklooksijenaz 2 (COX-2) enzimleri ile etkileşimlerini incelemek amacıyla bu enzimler üzerinde docking çalışmaları yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Doking çalışmaları için protein veri bankasından, COX-1 enzimi için (3KK6) ve COX-2 enzimi için (3LN1) seçilmiştir. Ligand ve proteinin yapıları Autodock 1.5.6 kullanılarak hazırlanmıştır.

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Begüm Evranos Aksöz
e-mail / e-posta: begumevranos@gmail.com, begumaksoz@sdu.edu.tr, **Phone / Tel:** +902462114303

Bağlanma afinitesini belirlemek için AutoDock Vina, doking sonuçlarını analiz etmek ve görüntülemek için ise Discovery Studio 3.5 kullanılmıştır.

Sonuç ve Tartışma: COX-1 ve COX-2 enzimleri üzerine yapılan doking işlemi sonucunda 4,5-dihidro-1H-pirazol türevlerinin her iki enzimle de etkileşime girdiği görüldü. 4,5-Dihidro-1H-pirazol halkasının COX-2 enzimi ile etkileşimde önemli olduğu bulundu. Yapıya hacimli bir grubun dahil edilmesi, COX-1 enzimi ile etkileşimde herhangi bir soruna neden olmazken, COX-2 enzimi ile bazı etkileşimleri ortadan kaldırdı. Enzimlerin inhibisyon özelliklerinin daha iyi aydınlatılabilmesi için bu çalışmanın *in vitro* ve *in vivo* COX inhibisyon testleri ile desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Siklooksijenaz 1, siklooksijenaz 2, 4,5-dihidro-1H-pirazol, inflamasyon, moleküler doking

INTRODUCTION

Inflammation, which is the body's protective response, occurs after an injury and/or an infection aims to heal the tissue and can be chronic or acute. Acute inflammation includes a highly coordinated physiological response, beginning with constructing soluble mediators such as chemokines and cytokines. Simultaneously, circulation of leukocytes and endothelial cells are provided to the injured/infected tissue. Nonsteroidal antiinflammatory drugs target the phase of the inflammation by inhibiting cyclooxygenase (COX) enzymes [1,2].

COX enzymes classified in the myeloperoxidase family are therapeutic targets for nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAID) [3-5]. All clinically used NSAIDs, except aspirin modify the COX protein noncovalently. These enzymes, which play a role in the catalysis of prostaglandin biosynthesis, consist of two basic isozymes, COX-1 and COX-2 [6]. NSAIDs display their activities on both of the COX isozymes. Since the inhibition of the COX-1 enzyme is responsible for the gastrointestinal and renal adverse effects of NSAIDs, it was thought that these side effects could be eliminated only by inhibiting the COX-2 enzyme [2]. When selective inhibition of the COX-2 enzyme appeared to cause serious cardiovascular problems, a balanced inhibition of both isozymes became important [7,8].

COX-1 and COX-2, which are homodimers of each other and have almost superimposable 3D structures, contain 3 and 4 high mannose oligosaccharides, respectively [6]. The active site of COX-2, unlike COX-1, includes a side pocket [9]. COX-2 enzyme has a broader substrate specificity than COX-1 [6]. These enzymes, most of which are located in the luminal region of the endoplasmic reticulum, are bifunctional [9]. Each COX monomer includes three domains: the epidermal growth factor domain, the membrane-binding domain, and the catalytic domain [6,9]. The catalytic domain, which is the site of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs, has peroxidase and cyclooxygenase active sites [4,6,9]. Arachidonic acid is oxygenated in the cyclooxygenase active site, while prostaglandin G₂ (PGG₂) is reduced in the peroxidase active site [9].

The pyrazole ring, a 5-membered ring system containing two nitrogen atoms, and its monounsaturated derivative, the 4,5-dihydro-1H-pyrazole ring, are in the structure of many nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) such as antipyrine, phenazone, metamizole and phenylbutazone [2].

These ring systems inhibit cyclooxygenase enzymes, particularly the COX-2 enzyme [10-16]. It is thought that these compounds, whose antidepressant and antimicrobial activities we have previously published [17-19], may inhibit the COX enzymes because of their similarity to celecoxib (Figure 1), which is a selective COX-2 inhibitor in terms of chemical structure and also carrying a 4,5-dihydro-1H-pyrazole ring in their structure. In this study, molecular docking interactions of some 4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives with COX-1 and COX-2 enzymes were investigated.

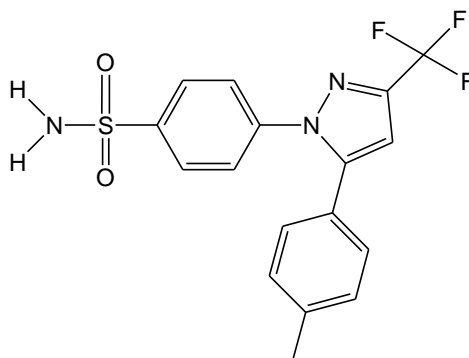


Figure 1. Formula of celecoxib

MATERIAL AND METHOD

The X-ray crystallographic structure of COX-1 (PDB: 3KK6) and COX-2 (PDB: 3LN1) were provided from Protein Data Bank [20]. 3KK6 is the crystal structure of COX-1 in complex with celecoxib, while 3LN1 is the construct of celecoxib bound at the COX-2 active site. 3KK6 has two chains. Chain A was selected. 3LN1 is composed of four symmetric chains and active sites of the protein present in all chains [21]. Chain A selected, and other chains were deleted.

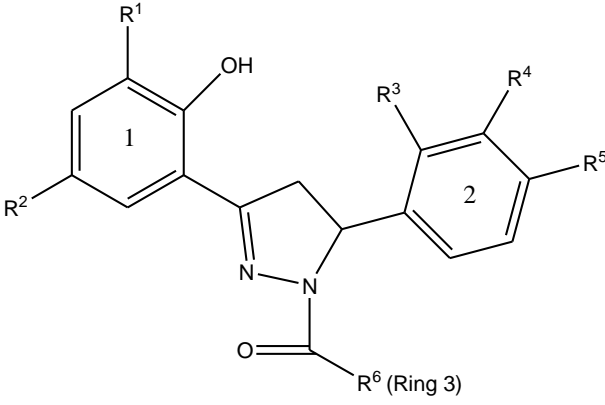
For preparing the protein and ligands (Table1) and determining the Grid map, Autodock 1.5.6 [22] was used. Chain A was selected. Then, the water was deleted, and polar hydrogens and Gasteiger charges were added. A grid map was determined. ChemDraw Ultra 12.0 was utilised to draw the 2D formula of the compounds. Energy minimisation was applied with Avogadro software [23]. The docking process was realised with Autodock Vina [24], and visualisation of interactions was made by Discovery Studio 3.5 [25]. To optimise the docking process, crystal structures of celecoxib (CEL) were compared with the predicted conformations of docking results. Superimposition of crystallised form and docking results of CEL was given in Figure 2.

RESULT AND DISCUSSION

Molecular docking interactions of 4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives were elucidated, and it

was observed that compounds interacted with both the COX-1 and COX-2 enzymes. When 4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives and celecoxib were docked in the 3KK6 enzyme, various interactions with

Table 1. The formula of ligands tested in molecular docking

						
Compound	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
BE1	-H	-Br	-OCH ₃	-H	- H	Pyridine-4-yl
BE2	-H	-Cl	-OCH ₃	-H	- H	Pyridine-4-yl
BE3	-Cl	-Cl	-OCH ₃	-H	- H	Pyridine-4-yl
BE4	-H	-Cl	-OCH ₃	-H	- H	Phenyl
BE5	-Cl	-Cl	-H	-H	- CH ₃	Phenyl
BE6	-H	-Br	-H	-H	-OCH ₃	Phenyl
BE7	-H	-Br	-OCH ₃	-H	- H	Phenyl
BE8	-H	-Cl	-H	-H	-benzyloxy	Pyridine-4-yl
BE9	-H	-Cl	-H	-OCH ₃	- H	Pyridine-4-yl
BE10	-H	-Cl	-H	- OCH ₃	- H	Furan-2-yl

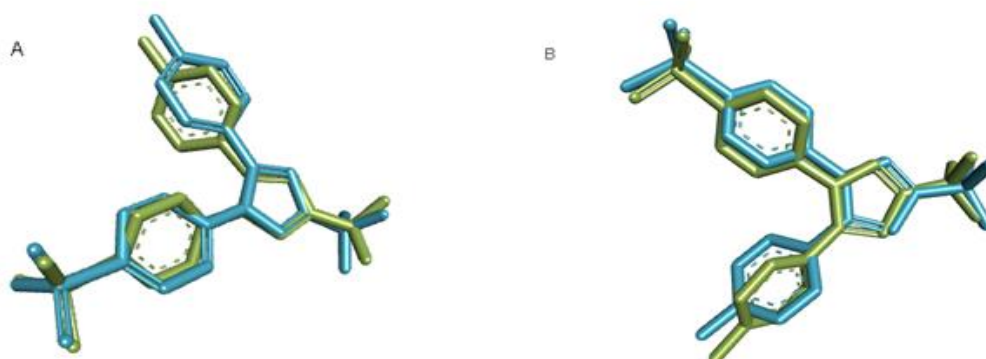


Figure 2. Superimposition of crystal form and docking result of celecoxib

A. For 3KK6, B. For 3LN1

HIS386, GLU454, PHE210, THR212, HIS207, ASP450, ASN382, LYS211, VAL291, VAL447, HIS388, ASP314, ARG307, ARG311, LYS573, GLU260, VAL261, TYR254, LYS251, TYR385, PRO218, ARG469, ILE124, ILE137, ILE46, LEU152, PRO125, GLU289, HIS274, LEU294, HIS446 amino acids were determined (Table 2). Binding energies of ligands were found between -7.3 and -9.1 kcal/mol for the COX-1 enzyme (Table 2). Celecoxib, the native ligand, interacted with THR212, PHE210, HIS446, VAL447, HIS207 and ASN382 amino acids (Figure 3A) with a binding energy of -7.6 kcal/mol. All compounds except BE6 and BE10 showed lower binding energies than celecoxib. Compound BE8 exhibited the best binding energy (-9.1 kcal/mol) with COX-1 enzyme and interacted with TYR385, VAL291, PRO218, HIS386, HIS207, GLU454, HIS388 amino acids through phenyl, pyridine, methyl and methylene groups of the molecule (Figure 3B). Compounds BE2, BE3 and BE4, displayed good interactions with the COX-1 enzyme with a binding energy of -8.1 kcal/mol. BE2 interacted with ASN382, HIS386, THR212, HIS207, VAL291, VAL447, PHE210 amino acids through phenyl, pyridine, chloro, hydroxy and methoxy groups. It made hydrogen bonds with hydroxy and methoxy groups (Figure 3C). BE3 interacted with ASN382, THR212, LYS211, VAL291, HIS207, HIS386, HIS388, PHE210 amino acids through phenyl at the 3rd position of 4,5-dihydro-1H-pyrazole ring, pyridine, chloro and hydroxy groups. BE4 interacted with HIS386, VAL291, HIS207, VAL447, PHE210, amino acids through phenyl, chloro and methoxy groups. The celecoxib was found to form two hydrogen bonds with THR212 and PHE210 inside the COX-1 enzyme. All compounds made 1 to 3 hydrogen bond interactions and some other interactions, except BE8, as shown in Table 2.

Compounds made interactions with HIS193, HIS374, PHE196, TYR371, ASN368, VAL277, VAL433, HIS372, ASN28, GLU27, LYS454, LYS64, LEU65, LYS459, PHE49, GLN440, LEU284, VAL281, LEU280, VAL430, ALA436, ARG46, ARG29, LEU60, THR47, TYR108, THR198, LYS197, LEU394, MET444, GLN189, ILE260, SER457, LEU458 amino acids in the active binding

site of COX-2 enzyme (Table 3). Binding energies of compounds were found between -7.7 and -9.0 kcal/mol.

Table 2. Binding energy values and interaction properties of celecoxib and 4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives for the COX-1 enzyme

Compound	Binding energy (kcal/mol)	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen bond	Alkyl/ π -Alkyl	π -Interactions	Halogen
BE1	-7.7	HIS386, GLU454, PHE210^a	THR212^a , HIS207^a , ASP450, ASN382^a	LYS211, VAL291	HIS207^a , HIS386	
BE2	-8.1	ASN382 , HIS386	THR212^a , HIS386	HIS207^a , VAL291, VAL447^a	PHE210^a , HIS207^a , HIS386	
BE3	-8.1	ASN382	THR212^a	LYS211, VAL291, HIS207^a , HIS386, HIS388,	HIS207^a , HIS386, HIS388, PHE210^a	
BE4	-8.1	HIS386	-	VAL291, HIS207^a , VAL447^a	HIS207^a , HIS386, PHE210^a	
BE5	-8.0	ASP314, ARG307	-	ARG311, LYS573, ARG307	GLU260, VAL261, TYR254	
BE6	-7.3	ARG307	-	ARG311, TYR254, LYS251, LYS573	GLU260, VAL261,	
BE7	-8.0	HIS386	THR212^a , ASN382^a	VAL291, VAL447^a	PHE210^a , HIS207^a , HIS386	
BE8	-9.1		TYR385	VAL291, PRO218	HIS386, HIS207^a , GLU454, HIS388	
BE9	-7.8	ARG469	ILE124	ILE137, ILE46, LEU152, PRO125	ARG469	
BE10	-7.5	GLU289	THR212^a	LYS211, HIS274, LEU294, VAL291	HIS386, PHE210^a , VAL291	
CELECOXIB	-7.6	THR212^a , PHE210^a		HIS446, VAL447^a , HIS207^a , PHE210^a	HIS207^a	ASN382^a

a. Bold amino acids show the same amino acid interactions with celecoxib

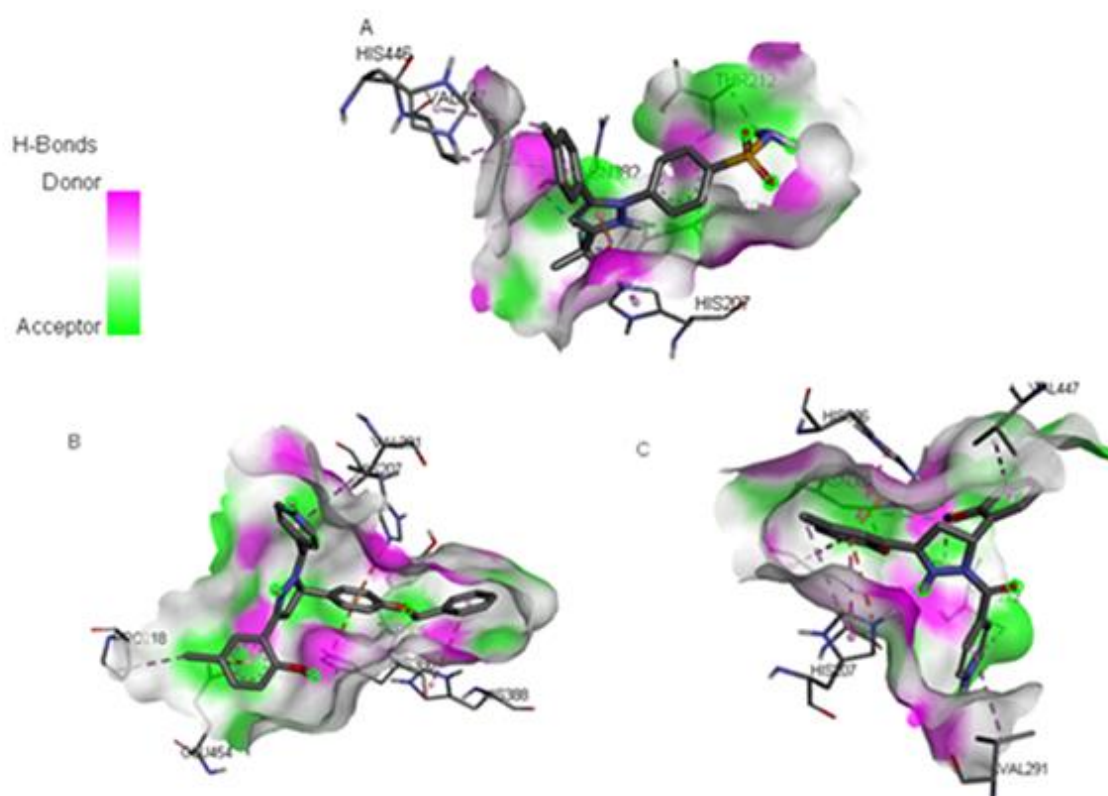


Figure 3. Molecular interactions of the COX-I enzyme

A. Docked pose of celecoxib, B. Docked pose of compound BE8, C. Docked pose of compound BE2

The celecoxib was found to form two hydrogen bonds to ARG29 and ARG46, halogen bonds, π and alkyl interactions (Figure 4A) inside the COX-2 enzyme with a binding energy -8.1 kcal/mol (Table 3). All compounds except BE1, BE7 and BE10 exhibited lower binding energies than celecoxib. BE5 and BE8 had the highest binding affinity for the COX-2 enzyme with -9 and -8.9 kcal/mol binding energies, respectively. The carbonyl group of BE5 made a hydrogen bond to THR198. Phenyl rings at the third and fifth positions of the 4,5-dihydro-1H-pyrazole ring of this compound made π - interactions with HIS193 and HIS372. While the phenyl ring attached to the carbonyl group made pi-alkyl interactions with amino acids, the methyl and chlorine groups in the compound BE5 made alkyl interactions (Figure 4B). The phenyl ring of BE8, attached to the p-position of the phenyl ring at the 5th position, made π interactions with HIS372 and MET444. Also, BE8 made alkyl and π -alkyl interactions with chloro and the phenyl ring at position 3 of 4,5-dihydro-1H-pyrazole, respectively (Figure 4C).

A chlorine atom in ring one enhanced common interactions when the compounds were evaluated for their co-interactions with celecoxib for the COX-1 enzyme. The best mutual interactions occurred when chlorine was in the 1st ring, methoxy in the ortho position of the 2nd ring, and pyridine in the 3rd ring. The ortho position of the methoxy group in the second ring is essential for common interactions. These interactions reduced when the o-substitution in the 2nd ring shifted to the meta or para positions.

Table 3. Calculated binding energy values and interaction properties of celecoxib and 4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives for the COX-2 enzyme

Compound	Binding energy (kcal/mol)	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Alkyl/ π -Alkyl	π -Interactions	Halogen
BE1	-8.0	HIS193, HIS374, PHE196	TYR371, ASN368	VAL277, VAL433	HIS372, HIS374,	
BE2	-8.3	ASN28^a , GLU27		LYS454^a , LYS64^a , LEU65^a , LYS459	PHE49	
BE3	-8.5	TYR371, HIS374,	GLN440, HIS372	VAL277, LEU284, VAL281, LEU280, VAL430, ALA436	VAL433, HIS193, HIS372,	
BE4	-8.3	ARG46^a		ARG29^a , LEU60	LYS64^a , THR47, TYR108^a	
BE5	-9.0	THR198		VAL281, LEU280, LYS197, VAL277, HIS374, VAL430, PHE196, HIS193, HIS372,	HIS193, HIS372,	
BE6	-8.2	PHE196, HIS374	HIS193	LEU394, VAL281, VAL433, VAL277	HIS372, HIS374, HIS193	
BE7	-8.0	ASN28^a		LEU65^a , LYS454^a	PHE49	
BE8	-8.9			VAL277, LYS197	HIS372, MET444	
BE9	-8.2	PHE196, HIS374, GLN189	ASN368, HIS193, TYR371	LEU280, VAL281, VAL277, VAL433, ILE260	HIS372, HIS193, HIS374	
BE10	-7.7	ASN28^a		LYS64^a , LEU65^a , LYS454^a , LYS459	PHE49	
CELECOXIB	-8.1	ARG29, ARG46^a ,		LYS64^a	LEU65^a , TYR108^a , ARG29	ASN28^a , LYS454^a , SER457, LEU458

a. Bold amino acids show similar interactions with celecoxib

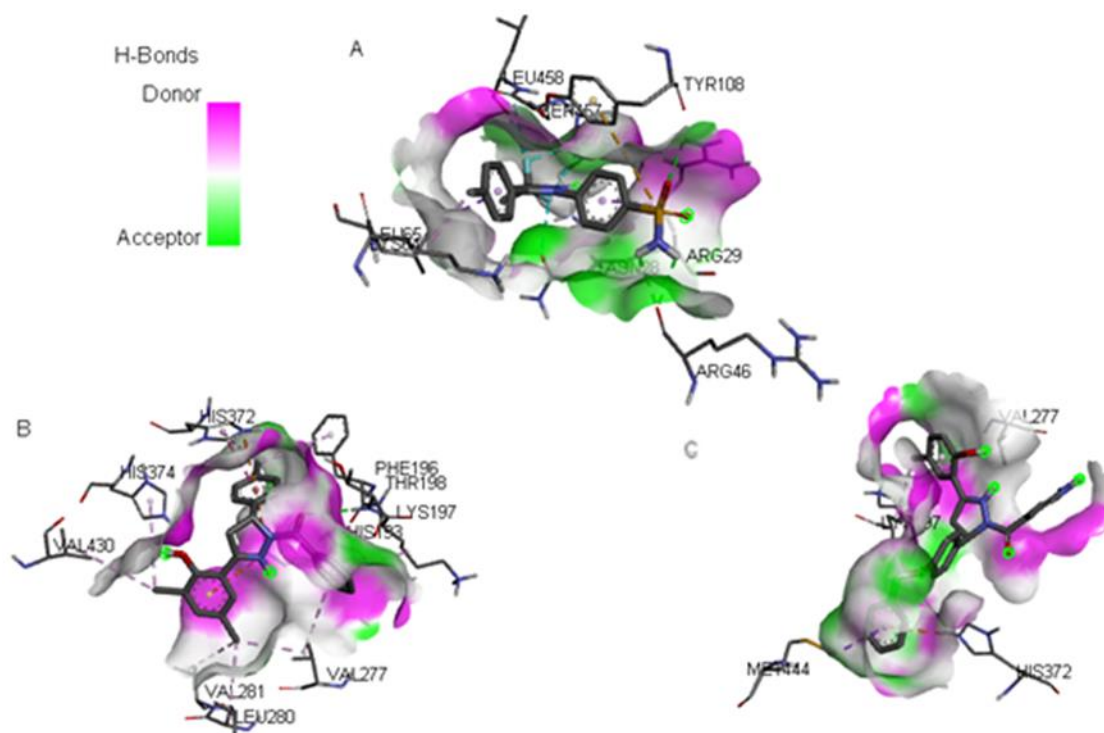


Figure 4. Molecular interactions of the COX-2 enzyme

A. Docked pose of celecoxib, B. Docked pose of compound BE5, C. Docked pose of compound BE8

Instead of *o*-methoxy substitution to the 2nd ring, *p*-benzyloxy substitution decreased common interactions. In contrast, these interactions increased when the *p*-benzyloxy substitution was made to the 2nd ring instead of *m*-methoxy substitution. While there is chlorine in the 1st ring and *o*-methoxy in the 2nd ring, replacing pyridine with phenyl in the 3rd ring decreased the mutual interactions with celecoxib. When there is the bromine in the 1st ring and *o*-methoxy substitution in the 2nd ring, replacing the pyridine with phenyl in terms of co-interactions with celecoxib didn't make much difference. When the methoxy attached to the 2nd ring was in the meta position, and there was chlorine in the 1st ring, replacing the pyridine in the 3rd ring with furyl increased the mutual interactions. Co-interactions with celecoxib disappeared when the 2nd ring had a methyl or methoxy group at the para position, and the 3rd ring was phenyl. A bromine atom in the 1st ring or two chlorine atoms in the 3rd and 5th positions did not make a big difference in mutual interactions.

When the interaction similarities of the compounds with celecoxib were evaluated in terms of the COX-2 enzyme, it was observed that replacing the chlorine atom in the 1st ring with bromine decreased the common interactions. In the presence of chlorine atoms in the 3rd and 5th positions of the 1st ring, these interactions were disappeared. While there was chlorine in the 1st ring and *m*-methoxy in the 2nd ring, the common interactions vanished due to the displacement of the furan with pyridine as the 3rd ring. In the presence of bromine in the 1st ring and *o*-methoxy in the 2nd ring, these interactions disappeared when the phenyl in the 3rd ring was replaced by pyridine. While the 1st ring was substituted

with chlorine, the 2nd ring with an o-methoxy group, the 3rd ring is phenyl or pyridine did not make a big difference in mutual interactions. When the p-benzyloxy group replaced the methoxy group in the ortho position of the second ring, the common interactions disappeared. While there was chlorine in the 1st ring and pyridine in the 3rd ring, these interactions were lost when the methoxy group in the 2nd ring moved from the ortho position to the meta position.

Consequently, the compounds interacted with both of the COX-enzymes. The phenyl ring in the 3rd position of the 4,5-dihydro-1H-pyrazole is essential in interaction with the COX-1 and COX-2 enzymes, and this phenyl interacted with amino acids in all compounds. Compounds made hydrogen bonds to their methoxy, hydroxy or carbonyl groups for the COX-1 enzyme. With the introduction of a bulky group such as benzyloxy into the structure of the BE8 compound, the interaction between the pyridine ring and amino acids for the COX-2 enzyme has disappeared. The introduction of the bulky group into the structure did not abolish the interaction between the pyridine ring and amino acids for the COX-1 enzyme. The compounds' methoxy, hydroxy, carbonyl, and 4,5-dihydro-1H-pyrazole groups made hydrogen bonds with the COX-2 enzyme. While the 4,5-dihydro-1H-pyrazole ring did not interact with the COX-1 enzyme, it played a role in interactions with the COX-2 enzyme. The 4,5-dihydro-1H-pyrazole ring is essential in interactions with the COX-2 enzyme, and this ring made hydrogen bonds with ASN28 in these interactions. *In vivo* and *in vitro* COX inhibition tests of these substances are required to obtain more detailed information about their inhibition properties.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: *B.E.A.*; Design: *B.E.A.*; Control: *B.E.A.*; Sources: *B.E.A.*; Materials: *B.E.A.*; Data Collection and / or Processing: *B.E.A.*; Analysis and / or Interpretation: *B.E.A.*; Literature Review: *B.E.A.*; Manuscript Writing: *B.E.A.*; Critical Review: *B.E.A.*; Other: *B.E.A.*

CONFLICT OF INTEREST

The author declares no conflict of interest.

REFERENCES

1. Fullerton, J., Gilroy, D. (2016). Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15, 551-567. [\[CrossRef\]](#)
2. Mantzanidou, M., Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D. Pyrazoles and pyrazolines as anti-inflammatory agents (2021). *Molecules*, 26(11), 3439. [\[CrossRef\]](#)

3. Turini, M.E., DuBois, R.N. (2002). Cyclooxygenase-2: A therapeutic target. *Annual Review of Medicine*, 53, 35-57. [\[CrossRef\]](#)
4. Chandrasekharan, N., Simmons, D.L. (2004). The cyclooxygenases. *Genome Biology*, 5(9), 241. [\[CrossRef\]](#)
5. Zarghi, A., Arfaei, S. (2011). Selective COX-2 inhibitors: A review of their structure-activity relationships. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10(4), 655-683. [\[CrossRef\]](#)
6. Rouzer, C.A., Marnett L.J. (2009). Cyclooxygenases: structural and functional insights. *Journal of Lipid Research*, 50, S29-34. [\[CrossRef\]](#)
7. Carvalho, L.C.R., Ribeiro, D., Seixas, R.S.G.R., Silva, A.M.S., Nave, M., Martins, A.C., Erhardt, S., Fernandes, E., Cabrita, E.J., Marques, M.M.B. (2015). Synthesis and evaluation of new benzimidazole-based COX inhibitors: a naproxen-like interaction detected by STD-NMR. *RSC Advances*, 5, 49098-49109. [\[CrossRef\]](#)
8. Ju, Z., Su, M., Hong, J., La Kim, E., Moon, H.R., Chung, H.Y., Kim, S., Jung, J.H. (2019). Design of balanced COX inhibitors based on antiinflammatory and/or COX-2 inhibitory ascidian metabolites. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 180, 86-98. [\[CrossRef\]](#)
9. Blobaum, A.L., Marnett, L.J. (2007). Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(7), 1425-1441. [\[CrossRef\]](#)
10. El-Sayed, M.A., Abdel-Aziz, N.I., Abdel-Aziz, A.A., El-Azab, A.S., ElTahir, K.E. (2012). Synthesis, biological evaluation and molecular modeling study of pyrazole and pyrazoline derivatives as selective COX-2 inhibitors and antiinflammatory agents. Part 2. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20(10), 3306-3316. [\[CrossRef\]](#)
11. El-Feky, S.A.H., El-Sami, Z.K.A., Osman, N.A., Lashine, J., Kamel, M.A., Thabet, H.K. (2015). Synthesis, molecular docking and antiinflammatory screening of novel quinoline incorporated pyrazole derivatives using the Pfitzinger reaction. *Bioorganic Chemistry*, 58, 104-116. [\[CrossRef\]](#)
12. Abdelall, E.K.A., Lamie, P.F., Ali, W.A.M. (2016). Cyclooxygenase-2 and 15-lipoxygenase inhibition, synthesis, antiinflammatory activity and ulcer liability of new celecoxib analogues: Determination of region-specific pyrazole ring formation by NOESY. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26(12), 2893-2899. [\[CrossRef\]](#)
13. Abdellatif, K.R., Elsaady, M.T., Abdel-Aziz, S.A., Abusabaa, A.H. (2016). Synthesis, cyclooxygenase inhibition and antiinflammatory evaluation of new 1,3,5-triaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives possessing methanesulphonyl pharmacophore. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(6), 1545-1555. [\[CrossRef\]](#)
14. Gedawy, E.M., Kassab, A.E., El Kerdawy, A.M. (2020). Design, synthesis and biological evaluation of novel pyrazole sulfonamide derivatives as dual COX2/5-LOX inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 189, 112066. [\[CrossRef\]](#)
15. Akhtar, W., Marella, A., Alam, M.M., Khan, M.F., Akhtar, M., Anwer, T., Khan, F., Naematullah M., Azam, F., Rizvi, M.A., Shaquiquzzaman, M.(2021). Design and synthesis of pyrazole-pyrazoline hybrids as cancer-associated selective COX-2 inhibitors. *Archive der Pharmazie*, 354, e2000116. [\[CrossRef\]](#)

16. Costa, R.F., Turones, L.C., Cavalcante, K.V.N., Rosa Júnior, I.A., Xavier, C.H., Rosseto, L.P., Napolitano, H.B., Castro, P.F.D.S., Neto, M.L.F., Galvão, G.M., Menegatti, R., Pedrino, G.R., Costa, E.A., Martins, J.L.R., Fajemiroye, J.O. (2021). Heterocyclic compounds: pharmacology of pyrazole analogs from rational structural considerations. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 666725. [CrossRef]
17. Evranos Aksoz, B., Ucar, G., Yelekçi, K. (2017). Design, synthesis and hMAO inhibitory screening of novel 2-pyrazoline analogues hMAO inhibitory screening of novel 2-pyrazolines. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 20, 510-521. [CrossRef]
18. Evranos Aksoz, B., Ucar, G., Taş S.T., Aksoz, E., Yelekci, K., Erikci, A., Sara, Y., Iskit, A.B. (2017). New hMAO-A inhibitors with potential antidepressant activity: design, synthesis, biological screening and evaluation of pharmacological activity. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 20, 461-473. [CrossRef]
19. Evranos Aksöz, B., Gürpınar, S.S., Eryılmaz, M. (2020). Antimicrobial activities of some pyrazoline and hydrazone derivatives. *Turkish Journal of Pharmaceutical Science*, 17, 500-505. [CrossRef]
20. Protein Data Bank (PDB) <https://www.rcsb.org/> [CrossRef]
21. Flamandita, D., Sahlan, M., Lischer, K., Pratami, D.K. (2019). Molecular docking study of antiinflammatory biomarkers in sulawesi propolis as potent inhibitors of cyclooxygenase-2. in *2nd IEEE International Conference on Innovative Research and Development, ICIRD 2019*, 9074773, Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., Depok, Indonesia, 28/06/19. [CrossRef]
22. AutoDockTools, the free GUI for AutoDock. [<http://autodock.scripps.edu/resources/adt>]. [CrossRef]
23. Hanwell, M.D., Curtis, D.E., Lonie, D.C., Vandermeersch, T., Zurek, E., Hutchison, G.R. (2012). "Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualisation, and analysis platform". *Journal of Cheminformatics*, 4, 17. [CrossRef]
24. Trott, O., Olson, A.J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimisation and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31, 455-461. [CrossRef]
25. Barnum, D., Greene, J., Smellie, A. and Sprague, P. (1996). Identification of common functional configurations among molecules. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 36, 563-571. [CrossRef]



A PRELIMINARY STUDY ON THE ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF *OPOPANAX HISPIDUS*

OPOPANAX HISPIDUS'UN ANTİOKSİDAN VE ANTİ-İNFLAMATUAR AKTİVİTELERİ
ÜZERİNE BİR ÖN ÇALIŞMA

Safa GÜMÜŞOK^{1*} , Sezen YILMAZ SARIALTIN² , Tülay ÇOBAN² ,
Ceyda Sibel KILIÇ¹ 

¹Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Ankara University, Tandoğan 06560,
Ankara, Turkey

²Department of Pharmaceutical Toxicology, Faculty of Pharmacy, Ankara University, Tandoğan
06560, Ankara, Turkey

ABSTRACT

Objective: *Opopanax W. Koch* genus is included in *Apiaceae* family. The genus can be distinguishable with its compound basal leaves, glabrous fruits, yellow flowers, tall stem with glochidate and stellate hairs. It is known with the name "Hercules' all-heal" throughout the world. It was used for the treatment of epilepsy, infertility in women, hemorrhoids and paralysis traditionally. This present research was designed to assess *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activity of *Opopanax hispidus* (Friv.) Griseb.

Material and Method: Methanol extracts were prepared from the aerial parts and flowers of the plants. Their antioxidant activities were analyzed through a number of chemical assays: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging assays. Anti-inflammatory activities of the extracts were compared and evaluated using human red blood cell membrane stability testing.

Result and Discussion: Aerial parts exhibited stronger ABTS and DPPH free radical scavenging activities than flowers. However, flowers were found to be more active than aerial parts in terms of anti-inflammatory effects ($IC_{50}=3,32$ mg/ml and 4,75 mg/ml; respectively). These data suggest that flowers and aerial parts of *Opopanax hispidus* exhibited antioxidant and anti-inflammatory effects. More research studies are necessary to determine the active ingredients in charge of this activity.

Keywords: ABTS, anti-inflammatory, antioxidant, DPPH, *Opopanax hispidus*

ÖZ

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Safa Gümüşok
e-mail / e-posta: safagumusok@gmail.com, **Phone / Tel:** +905449674616

Amaç: *Opopanax W. Koch* cinsi, *Apiaceae* familyasında yer alır. Cins, bileşik bazal yaprakları, tüysüz meyveleri, sarı çiçekleri, gloşidat ve yıldızlı tüyleri olan uzun gövdesi ile ayırt edilebilir. Dünya çapında “Herkül’ün her şeyi iyileştireni” adıyla bilinir. Halk arasında epilepsi, kadınlarda kısırlık, hemoroid ve felç tedavisi için kullanılır. Bu araştırma, *Opopanax hispidus* (Friv.) Griseb’in in vitro antioksidan ve anti-inflamatuar aktivitesini değerlendirmek için tasarlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bitkinin toprak üstü kısımlarından ve çiçeklerinden metanol ekstreleri hazırlandı. Antioksidan aktiviteleri bir dizi kimyasal deneyle analiz edildi: 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS) ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal süpürme deneyleri. Ekstrelerin anti-inflamatuar aktiviteleri insan kırmızı kan hücresi membran stabilite testi kullanılarak karşılaştırıldı ve değerlendirildi.

Sonuç ve Tartışma: Toprak üstü kısımları, çiçeklerden daha güçlü ABTS ve DPPH serbest radikal temizleme aktiviteleri sergiledi. Ancak anti-inflamatuar etki açısından çiçeklerin toprak üstü kısımlardan daha aktif olduğu bulundu (IC50=3,32 mg/ml ve 4,75 mg/ml, sırasıyla). Bu veriler, *Opopanax hispidus*'un çiçek ve toprak üstü kısımlarının antioksidan ve anti-inflamatuar etkiler sergilediğini göstermektedir. Bu aktiviteden sorumlu aktif içerikleri belirlemek için daha fazla araştırma çalışması gereklidir.

Anahtar Kelimeler: ABTS, anti-inflamatuar, anti-oksidan, DPPH, *Opopanax hispidus*

INTRODUCTION

Apiaceae is known as parsley or carrot family having more than 300 genera with not less than 3000 species. They grow naturally in the northern hemisphere [1]. This large family attracts attention due to its diverse secondary metabolites, and also its great economic and medical value [2].

Opopanax species are known with the names Kaymakotu, Kaymacık and Kirkozar in Turkey [3] and with the name “Hercules’ all-heal” in the world. English name of genus give us a hint about its usage. When etimologically examined the word “*Opopanax*”, it is derived from the words “opos” and “panax”. The word “opos” means usare (vegetable juice) and the word “panax” (panacea) means all-healing, universal remedy [4].

Opopanax W. Koch, a genus of the *Apiaceae* family has 4 species: *Opopanax hispidus* (Friv.) Gris., *Opopanax chironium* (L.) W. Koch, *Opopanax persicus* Boiss., and *Opopanax siifolius* (Boiss. & Heldr.) Menemen. *Opopanax* species are traditionally being used both in Turkey and throughout the world due to their medical effects. Gum derived from *O. chironium*'s stem is used in the treatment of epilepsy among people in Iran [5]. *O. chironium* was used in the treatment of epilepsy during the Renaissance period [6]. As a result of an excavation conducted in Cairo, *O. chironium* was found that this species was used in colic and colds, eye diseases, convulsions, tetany and to strengthen erections in the Middle Ages [7]. It has been reported that the ointment prepared with the mixture of fat-gum-resin (oleogumresin) obtained from *O. chironium* used against all cancers in traditional Islamic medicine [8]. *O. chironium* has been used for antinociceptive against headache, joint pain and rheumatoid arthritis, as well as, diuretic in traditional Iranian medicine [9]. *O. hispidus* is consumed as food in and around Kazdağı [10]. In a study conducted in the Ilcalı region of Erzurum, it was reported that the fresh bodies of *O. hispidus* were eaten and thus used to treat female infertility [11]. In the study conducted in Egirdir, powdered leaves of *O. hispidus* were found to be used in the treatment of hemorrhoids by eating [12].

In Turkey, *O. hispidus* is located in a group of plants known as “Mayasıl otu” and has been reported to be used in the treatment of hemorrhoids [13]. In “Dynameron” writing around 10th-11th centuries, *O. hispidus* was reported to be used as an antidote [14]. It has been reported that the stem, leaf and inflorescence of *O. hispidus* are utilized as antiseptic by smoking [15]. There is information about the resin obtained from *O. persicus* is used to treat paralysis from nasal way, but no more details are given [16]. There is no information about *O. siifolius* (*Crenosciadium siifolium*).

Since these species have been used for antinociceptive effects against headache and joint pain, in this study we aimed to investigate antioxidant and anti-inflammatory activities of *O. hispidus* that grows naturally in Turkey.

MATERIAL AND METHOD

Plant Samples

Plant samples were gathered from the following locality and voucher specimens are kept in AEF (Herbarium of Ankara University, Faculty of Pharmacy):

C3: Akseki, Sadıklar Village entrance, near the fields, 978 m, H. Duman, C.S. Kılıç, 20/6/2016.

O. hispidus' aerial parts and flowers, first macerated with methanol for 8 hours 3 times, were evaporated with a rotary evaporator (Heidolph WB 2000&VV2000).

Chemicals

Trolox, acetylsalicylic acid (ASA), butylated hydroxytoluene (BHT), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) were bought from Sigma-Aldrich. Dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol and the other solvents were bought from Merck.

Antioxidant Activity

ABTS^{•+} Free Radical Scavenging Activity

ABTS radical cation decolorization assay was utilized to measure the total antioxidant activity of the samples [17]. ABTS was prepared by the reaction of 7 mM ABTS+ aqueous solution with 2.45 mM potassium persulfate. The experiment mixture was left to wait for a night (12 to 16 h) in the dark with a temperature of 25°C before usage. To assign an absorbance value of 0.700±0.02 at 734 nm, the resultant strongly-colored ABTS radical cation was diluted with ethyl alcohol, pH 7.4. The compound was diluted 100x with the ABTS solution to a total volume of 1 ml. After addition, the experiment mixture was left to wait 6 min at room temperature. Then the absorbance was measured spectrophotometrically at 734 nm and inhibition percentage was computed. The assay was conducted three times for one extract. On a regular time basis (every five days) fresh stocks of ABTS^{•+} solution were made available for avoiding self-degradation of the radical. Trolox, that is the water-soluble α -tocopherol analogue, was utilized as a standard. The findings were presented as radical scavenging activity percentage (%) of the ABTS,

defined by the below formula: $[(A_o - A_s)/A_o] \times 100$; which is A_o means the absorbance of the control and A_s is the absorbance with the sample or standard. For each plant extract and standard, half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values were figured from a calibration curve.

DPPH Free Radical Scavenging Activity

The DPPH free radical scavenging activities of the plant methanolic extracts were assessed by their capacity to decolorize the stable radical DPPH [18]. Various concentrations of the extracts and 100 μ M DPPH in methanol constituted the reaction mixture. The mixture was first shaken, then left to wait in dark for half an hour at the aforementioned temperature (25°C). Then at 517 nm, the absorbance was measured and free radical scavenging activity was computed as the percentage of radical reduction. The absorbance of the prepared solution was adapted to 0.700 ± 0.02 at 517 nm. BHT was chosen as a reference compound. Each experiment was conducted in triplicate. Percentage of DPPH radical scavenging activity was computed by the below formula; $[(A_o - A_s)/A_o] \times 100$, which is A_o means the absorbance of the control and A_s is the absorbance with the sample or standard. IC_{50} values were calculated from a calibration curve for each plant extract and standard compound.

Anti-inflammatory Activity (*)

Preparation of Human Red Blood Cells Suspension

A healthy human volunteer without a record of anti-inflammatory or steroidal drug use for the past 2 weeks before the experiment provided fresh whole human blood which was later transmitted to centrifuge tubes. The tubes were centrifuged for 10 min at 3000 rpm. The appropriate volume of sterile isosaline (0.85%, pH 7.2) was used to wash the packed cells. The blood volume was measured and remade as 10% v/v suspension with isosaline [19; 20].

Heat-Induced Hemolysis

The human erythrocyte hemolysis assay which is induced by heat evaluated membrane stabilizing activity of the samples, using previously described methods with slight modifications [19; 20]. Test samples (methanolic extracts) and 10% red blood cell suspension constituted the experiment mixture. The only solvent was used as a negative control. Each centrifuge tube including the experiment mixture was incubated in a water bath for half an hour at 56°C. At the end of the incubation period, the centrifuge tubes were left for cooling under running water. The available mixture was centrifuged for 5 mins at 2500 rpm, then the supernatant absorbance was measured at 560 nm. This experiment was carried out three times for each sample. ASA was utilized as the reference drug. Percentage of protection was computed by the below formula; $100 - [(A_s/A_o) \times 100]$, which is A_o means the absorbance of the control and A_s is the absorbance with the sample or standard. The results were represented as IC_{50} for each plant extract and the standard compound.

Statistical Analysis

All of the experiments were conducted three times and the findings were displayed as mean $IC_{50} \pm SD$. IBM SPSS Version 25.0 was used to carry out statistical analyses, namely one-way analysis of variance (ANOVA) and post hoc Tukey test with 95% confidence level for normally distributed groups. The results, which were accepted as statistically significant, were p-values less than 0.05.

RESULT AND DISCUSSION

Antioxidant Activity

ABTS^{•+} Free Radical Scavenging Activity

ABTS free radical scavenging activities of the flowers and aerial parts of *O. hispidus* and the reference compound were presented in Table 1. Trolox was found more active than the extracts ($p=0.0001$). The maximum antioxidant capacity was detected for aerial parts by ABTS free radical scavenging assay with an IC_{50} value of $0,33 \pm 0,02$ mg/ml. Flowers showed lower ABTS scavenging activity than aerial parts ($IC_{50}=0,40 \pm 0,02$ mg/ml).

Table 1. ABTS free radical scavenging activity of flowers and aerial parts of *O. hispidus*

Plant extract	IC50 (mg/ml) Mean \pm SD
Flower	0,3958 \pm 0,018
Aerial parts	0,3245 \pm 0,016
Trolox	0,0150 \pm 0,001

DPPH Free Radical Scavenging Activity

DPPH free radical scavenging activities of the flowers and aerial parts of *O. hispidus* and the reference compound were presented in Table 2. BHT was found more active than the extracts ($p=0.0001$). Similar to the findings of previous activity (ABTS), the highest antioxidant potential was detected for aerial parts by DPPH free radical scavenging assay with an IC_{50} value of $0,50 \pm 0,01$ mg/ml. Flowers showed lower DPPH scavenging activity than aerial parts ($IC_{50}=0,54 \pm 0,01$ mg/ml).

Table 2. DPPH free radical scavenging activity of flowers and aerial parts of *O. hispidus*

Plant extract	IC50 (mg/ml) Mean \pm SD
Flower	0,5405 \pm 0,0127
Aerial parts	0,5022 \pm 0,0075
BHT	0,0188 \pm 0,0004

Anti-inflammatory Activity

Human Red Blood Cell Membrane Stabilizing Activity

The cell membrane stabilizing activities of flowers and herbs of *O. hispidus* were presented in Table 3. Contrary to the results of ABTS and DPPH free radical scavenging activities, the maximum membrane stabilization activity was detected for methanol extracts of flowers with an IC₅₀ value of 3,32±0,03 mg/ml. Aerial parts exhibited lower membrane stabilizing activity than flowers with IC₅₀ values of 4,75±0,003 mg/ml. Flowers of *O. hispidus* are more effective than aerial parts of *O. hispidus*. ASA was more effective on that activity than the extracts significantly (p=0.0001).

Table 3. The cell membrane stabilizing activity of flower and herbs of *O. hispidus*

Plant extract	IC ₅₀ (mg/ml) Mean ± SD
Flower	3,3177 ± 0,0255
Aerial parts	4,7533 ± 0,0034
ASA	0,2910 ± 0,008

Opopanax genus has been used in traditional medicine for numerous reasons. In previous studies for methanol extracts of aerial parts of *O. hispidus*, antioxidant capacity was found as follows: ABTS: 0.08 ± 0.032 mmol Trolox equivalent g⁻¹ extract [21]. Matejić et al reported that methanolic extracts of inflorescences of *Opopanax hispidus* showed the highest scavenging activities on DPPH and ABTS free radicals compared to aerial parts and fruits (IC₅₀=1.157 mg/mL and 3.14 ± 0.006 Vit C/g, respectively) [22]. Similarly, the greatest total phenolic (89.95 ± 0.005 mg GA/g) and total flavonoid content (24.06 ± 0.004 mg Qu/g) was found in methanol extracts of inflorescences parts [21]. In another study, radical scavenging potentials of the ethanol extracts of aerial parts of *O. hispidus* were found 88.27 ± 0.45 mg Trolox equivalent/g extract for DPPH and 138.07 ± 1.48 mg Trolox equivalent /g extract for ABTS [23].

We examined radical scavenging and erythrocyte membrane stabilization capacities of different parts of *O. hispidus*. To our knowledge, this article is the first report to showing the anti-inflammatory capacity of this plant. ABTS and DPPH radical scavenging activities were found higher for aerial parts than flowers, but not a serious margin. Naturally-occurring plant pigments, phenolic compounds, terpenes are secondary metabolites of plants that are the best known for their ability to scavenge free radicals [17, 24]. Phenolic substances are known to be responsible for the antioxidant effect that medicinal plants possess [25, 26]. The antioxidant effect may be due to its rich content. On the contrary of antioxidant activity, flowers were found to be more effective in anti-inflammatory assay than aerial parts. Flowers and especially yellow flowers are known to be rich in flavonoids [27]. There is strong

evidence suggesting that flavonoids prevent and reduce inflammation by means of multiple mechanisms. This plant secondary metabolites reduce inflammatory cytokine production, decrease inflammation-promoting cells' recruitment, and modulate inflammatory pathways [28]. Therefore, it is not surprising that flowers were found to be more effective than aerial parts in anti-inflammatory activity assay. Further studies should be conducted to clarify the phytochemical content, flavonoid and phenolic profile of this species.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept : S.G., S.Y.S., T.Ç., C.S.K.; Design: S.G., S.Y.S., T.Ç., C.S.K.; Control: S.G., S.Y.S., T.Ç., C.S.K.; Sources: S.G., S.Y.S., T.Ç., C.S.K.; Materials: S.G., S.Y.S., T.Ç., C.S.K.; Data Collection and/or processing: S.G., S.Y.S., T.Ç., C.S.K.; Analysis and/or interpretation: S.G., S.Y.S., T.Ç., C.S.K.; Literature review: S.G., S.Y.S., T.Ç., C.S.K.; Manuscript writing: S.G., S.Y.S., T.Ç., C.S.K.; Critical review: S.G., S.Y.S., T.Ç., C.S.K.; Other: S.G., S.Y.S., T.Ç., C.S.K.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

The Ethics Committees of the Faculty of Medicine of Ankara University, Ankara-Turkey approved the study protocol with acceptance number of 26.10.2015/16-695-15.

REFERENCES

1. Downie, S.R., Katz-Downie, D.S., Watson, M. F. (2000). A phylogeny of the flowering plant family Apiaceae based on chloroplast DNA rpl16 and rpoC1 intron sequences: towards a suprageneric classification of subfamily Apioideae. *American Journal of Botany*, 87, 273–292. [CrossRef]
2. Olle, M., Bender, I. (2010). The content of oils in umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research*, 8, 687–696. [CrossRef]
3. Colcimen, N., Arihan, O., Gumusok, S., Kilic, C.S. (2020). Effect of The Opopanax Hispidus Plant's Aerial Parts Extract on Mice Ovary. *Selcuk Med J*, 36(1), 44-47. [CrossRef]
4. <https://www.etymonline.com/search?q=opos> - erişim tarihi 13.01.2019
5. Sahranavard, S., Ghafari, S., Mosaddegh, M. (2014). Medicinal plants used in Iranian traditional medicine to treat epilepsy. *Seizure*, 23, 328-332. [CrossRef]

6. Adams, M., Schneider, S., Kluge, M., Kessler, M., Hamburger, M. (2012). Epilepsy in the Renaissance: A survey of remedies from 16th and 17th century German herbals. *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 1-13. [\[CrossRef\]](#)
7. Lev, E., Amar, Z. (2008). Fossils of practical medical knowledge from medieval Cairo. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 24-40. [\[CrossRef\]](#)
8. Javadi, B., Iranshahy, M., Emami, S.A. (2015). Anticancer Plants in Islamic Traditional Medicine, Complementary Therapies for the Body, Mind and Soul. Editör: Marcelo Saad, InTech, DOI: 10.5772/61111 [\[CrossRef\]](#)
9. Farzaei, M.H., Farzaei, F., Abdollahi, M., Abbasabadi, Z., Abdolghaffari, A.H., Mehraban, B. (2016). A mechanistic review on medicinal plants used for rheumatoid arthritis in traditional Persian medicine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68, 1233-1248. [\[CrossRef\]](#)
10. Ahıskalı, M., Arı, Ç., Selvi, S. (2012). Edible wild plants and their consumption during winter in a rural village on Kazdağı (Mount Ida). *Boccone*, 24, 195-198. [\[CrossRef\]](#)
11. Özgen, U., Kaya, Y., Houghton, P. (2010) Folk medicines in the villages of Ilıca District (Erzurum, Turkey). *Turkish Journal of Biology*, 36, 93-106 [\[CrossRef\]](#)
12. Tuzlacı, E., Erol, M.K. (1999). Turkish folk medicinal plants. Part II: Eğirdir (Isparta). *Fitoterapia*, 70, 593-610. [\[CrossRef\]](#)
13. Sevgi, E., Kızıllarlan, Ç. (2013). Bir İsim Çok Bitki - Mayasıl Out. *Avrasya Terim Dergisi*, 1, 17-29. [\[CrossRef\]](#)
14. Valiakos, E., Marselos, M., Sakellaridis, N., Constantinidis, Th., Skaltsa, H. (2015). Ethnopharmacological approach to the herbal medicines of the “Antidotes” in Nikolaos Myrepsos’ Dynameron. *Journal of Ethnopharmacology*, 163, 68-82. [\[CrossRef\]](#)
15. Amiri, M.S., Joharchi, M.R. (2015). Ethnobotanical knowledge of Apiaceae family in Iran: A review. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 6, 621-635 [\[CrossRef\]](#)
16. Abolhasanzadeh, Z., Ashrafib, H., Badra, P., Azadia, A. (2017). Traditional neurotherapeutics approach intended for direct nose to brain delivery. *Journal of Ethnopharmacology*, 209, 116-123. [\[CrossRef\]](#)
17. Yalçın, C.Ö., Yılmaz Sarıaltın, S., Çiçek Polat, D. (2020). Quantification of phenolic and flavonoid contents and some biological activities of *Ornithogalum sigmoideum* Freyn & Sint. *J Res Pharm.*, 24(4), 487-496. [\[CrossRef\]](#)
18. Blois, M.S. (1958). Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199–1200. [\[CrossRef\]](#)
19. Anosike, C.A., Obidoa, O., Ezeanyika, L.U. (2012). Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). *Daru*, Nov 14, 20(1), 76. doi: 10.1186/2008-2231-20-76. [\[CrossRef\]](#)
20. Gunathilake, K.D.P.P., Ranaweera, K.K.D.S., Rupasinghe, H.P. (2018). In vitro anti-inflammatory properties of selected green leafy vegetables. *Biomedicines*, 6(4), 107. [\[CrossRef\]](#)

21. Alpınar, K., Özyürek, M., Kolak, U., Güçlü, K., Aras, Ç., Altun, M., Çelik, S. E., Berker, K. I., Bektaşoğlu, B., Apak, R. (2008) Antioxidant Capacities of Some Food Plants Wildly Grown in Ayvalık of Turkey, *Food Science and Technology Research*, 15, 59-64. [\[CrossRef\]](#)
22. Matejić, J., Džamić, A., Mihajilov-Krstev, T., Randelović, V., & Marin, P. (2015). Antioxidant and antimicrobial potential of *Opopanax hispidus* (Apiaceae) extracts. *Lekovite sirovine*, (35), 141-150. [\[CrossRef\]](#)
23. Sarıkürkçü, C., Targan, ř., Özer, M. S., Tepe, B. (2016) Fatty acid composition, enzyme inhibitory, and antioxidant activities of the ethanol extracts of selected wild edible plants consumed as vegetables in the Aegean region of Turkey, *International Journal of Food Properties*, 20, 560-572. [\[CrossRef\]](#)
24. Sarialtin, S. Y., Coban, T. (2018). An Overview on the Role of Macular Xanthophylls in Ocular Diseases. *Records of natural products*, 12(2). [\[CrossRef\]](#)
25. Okur, M. E., Özbek, H., Polat, D. Ç., Yılmaz, S., & Arslan, R. (2018). Hypoglycemic activity of *Capparis ovata* desf. var. *palaestina* zoh. methanol extract. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(3). [\[CrossRef\]](#)
26. Çiçek Polat, D, Yılmaz Sarialtin, S, Çoban, T, Coşkun, M. (2019). Comparison of Walnut (*Juglans regia* L.) and Olive (*Olea europaea* L.) Leaves in Terms of Antioxidant and Anti-inflammatory Activity. *Adıyaman University Journal of Science*, 9 (2), 242-251. [\[CrossRef\]](#)
27. Samuelsson, G., Bohlin, L. (Eds.), 2009, *Drugs of Natural Origin – A Treatise of Pharmacognosy*, Swedish Pharmaceutical Society, Swedish Pharmaceutical Pressi P.O Bix. 1136, S-111, 81 Stockholm, Sweden
28. Pan, M. H., Lai, C. S., Ho, C. T. (2010). Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food & function*, 1(1), 15-31. [\[CrossRef\]](#)



ANTEP FISTIĞI (*PISTACIA VERA* L.) MEYVE KABUĞU: BİYOAKTİF BİLEŞİKLER İÇİN POTANSİYEL KAYNAK

PISTACHIO (PISTACIA VERA L.) FRUIT HULL: POTENTIAL SOURCE FOR BIOACTIVE COMPOUNDS

Muhammed Mesud HÜRKÜL* 

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, 06560, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu derleme çalışması, ekonomik öneme sahip olan Antep fıstığı (*Pistacia vera* L.) meyvesinin ticari bakımdan değersiz bir atık ürünü olan meyve kabuklarının eczacılık açısından değerlendirilmesi ve ekonomiye katkı sağlayacak şekilde farklı ürünlere dönüştürülebilme potansiyeli araştırılmıştır. Bu amaçla, şimdiye kadar yapılan fitokimyasal ve biyolojik aktivite çalışmaları derlenmiştir.

Sonuç ve Tartışma: Yapılan fitokimyasal çalışmalar bitkinin meyve kabuklarının galik asit ve türevleri, flavonoidler ve anakardik asitler içerdiğini göstermiştir. Ayrıca yapılan biyoaktivite çalışmaları Antep fıstığı meyve kabuklarının antioksidan, antimikrobiyal, anti-inflamatuar, anti-tirozinaz, anti-kanser ve yara iyi edici aktivitelerinin olduğunu göstermiştir. Bu derleme çalışması tarımsal gıda atığı olan Antep fıstığı meyve kabuklarından elde edilecek biyoaktif moleküllerin eczacılık alanında değerlendirilebilme potansiyelinin olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyolojik aktivite, derleme, kimyasal içerik, meyve kabuğu, *Pistacia vera*, yan ürün

ABSTRACT

Objective: In this review, the evaluation of the pistachio (*Pistacia vera* L.) fruit hull, which is an economically worthless by-product, in terms of pharmacy and the potential to be transformed into different products to contribute to the economy was investigated. For this purpose, the results of phytochemical and biological activity studies were evaluated.

Result and Discussion: Phytochemical studies have shown that the fruit hull of the plant contain gallic acid and its derivatives, flavonoids and anacardic acids. In addition, bioactivity studies have shown that pistachio fruit hulls have antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, anti-tyrosinase, anti-cancer and wound healing activities. This review study has shown that bioactive molecules obtained from pistachio fruit hulls, which are agricultural food waste, have the potential to be utilized in the field of pharmacy.

Keywords: Biological activity, review, chemical content, fruit hull, *Pistacia vera*, by-product

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Muhammed Mesud Hürkül
e-posta / e-mail: mhurkul@ankara.edu.tr

GİRİŞ

Anacardiaceae familyasında yer alan *Pistacia* L. cinsi tropik Asya, Avrupa, Afrika, Güney Amerika, Kuzey Amerika ve Asya'nın ılıman bölgelerinde doğal olarak yetişir. Bu cins dünya genelinde 11 tür ile temsil edilir. Merkez Asya'dan Afganistan'a kadar uzanan alanda (Afganistan, Kazakistan, Kırgızistan, Tacikistan, Türkmenistan, Özbekistan) doğal olarak yetişen *Pistacia vera* L. (Antep fıstığı)'nın, Türkiye, Fransa, Yunanistan, İran, İtalya, Libya, Fas ve İspanya'da kültürü yapılmaktadır. 10 m.'ye kadar boylanabilen antepfıstığı ağacı tek tohumlu bir meyveye sahiptir. Tohum, ince bir testa ile sarılı, etlenmiş iki kotiledondan oluşur, bunu kemiksi, sert yapıya sahip endokarp sarar, epikarp ve mezokarp ise meyvenin kabuk kısmını oluşturur. Türkiye'de bitkinin "Uzun", "Kırmızı", "Halebi" ve "Siirt" olmak üzere 4 kültür varyetesinin ekimi yapılmaktadır, bu varyeteler meyve dış kabuk renginden sırasıyla "morumsu pembe", "kırmızımsı mor", "kiraz pembesi" ve "ateş rengi" olarak ayırt edilebilmektedir [1-4].

Antep fıstığı gıda olarak kullanılan büyük ekonomik öneme sahip bir tarım ürünüdür. Dünya genelinde, 2018 yılında İran (551.307 ton) ve Amerika Birleşik Devletleri (447.700 ton)'nden sonra Türkiye 240.000 ton ile antepfıstığı üretiminde üçüncü sırada gelmektedir [5]. Türkiye'de 2019 yılında ise toplam 52.061 tane meyve veren antep fıstığı ağacından toplamda 85.000 ton ürün elde edilmiştir [6].

Antep fıstığı meyvesinden elde edilen tohum dünya genelinde çerez şeklinde gıda olarak kullanılmakta ve ticareti yapılmaktadır. Bunun dışında antep fıstığı tohumları işlenerek hamur işi, dondurma, çikolata, şekerleme gibi ticari ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Bu işleme sırasında meyve kabuğu, antep fıstığının en büyük atık ürünü olarak (meyvenin yaklaşık %35-45 kısmı) ortaya çıkar. Bu durumda üreticiye ek masraf çıkaran ve ticari değeri olmayan büyük miktarda atık oluşur. Ortaya çıkan bu yan ürünün değerlendirilmesi ve ekonomiye katkı sağlayacak şekilde farklı ürünlere dönüştürülmesi ekonomik bir kazanım olarak düşünülebilir [7-8]. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), her yıl dünyada insan tüketimi için üretilen tüm gıdanın yaklaşık üçte birinin kaybolduğunu veya israf edildiğini tahmin ediyor [9]. Bu tarımsal gıda yan ürünleri üzerine yapılan araştırmalar, nutrasötiklerin, fonksiyonel gıdaların ve gıda katkı maddelerinin üretimi için mükemmel bir molekül havuzu sağlayan geniş bir yapı ve işlevsellik çeşitliliği de dahil olmak üzere çok çeşitli doğal biyoaktif bileşikleri ortaya çıkarmıştır. Tarımsal gıda atıklarından değerli biyomoleküllerin (vitaminler, mineraller, proteinler, alkaloidler, antioksidan polifenoller, lipitler, şekerler, pektin, diyet lifleri ve uçucu bileşikler gibi) çıkarılması ve bu biyomoleküllerin eczacılık alanında değerlendirilmesi bitkisel kaynaklı ilaç hammaddeleri için hem bir kaynak, hem de yeni moleküllerin bulunup değerlendirilmesi için büyük bir şans olarak görülmektedir [10].

Antep Fıstığı Meyve Kabuğunun Kimyasal İçeriği

P. vera meyve kabuklarından hazırlanan metanol ekstresi ile yapılan HPLC analizinde, ekstrenin rutin (1.6 µg/g), eriyodiktiyol (10.2 µg/g), kersetin (14.9 µg/g), luteolin (10.0 µg/g), naringenin (1.2 µg/g) ve apigenin (0.2 µg/g) fenolik bileşiklerini içerdiği tespit edilmiştir [11]. Bitkinin meyve kabuklarından hazırlanan %80'lik metanol ekstresinin, kloroform fraksiyonundan 3-Epimastikadiyenolik asit izole edilmiş ve kimyasal yapısı spektrometrik yöntemlerle aydınlatılmıştır [12]. 7 farklı etanol-su karışımı [100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 (v:v)] ile hazırlanan antep fıstığı meyve kabuğu ekstralarının toplam fenolik madde içeriğine Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak bakılmış ve ekstraların toplam fenolik madde içerikleri gallik asit eşdeğeri olarak 21.07-39.03 mg/g ekstre aralığında bulunmuştur. Sonuçlar, %40'lık etanolün fenolik bileşikler elde etmek için en iyi çözücü karışımı olduğunu ortaya koymuştur. En düşük fenolik içerik ise %100 etanol ile elde edilmiştir [13].

P. vera meyve kabuğunun, 110 ve 190 °C aralığında 6.9 MPa basınçta ve 4 ml/dakika akış hızında süperkritik su ekstraksiyonu (SCW) ve ultrasonik banyo ile metanol/su/formik asit (80/19/1, v/v/v) ekstresi hazırlanmıştır. HPLC-DAD-ESI/MSⁿ ile ekstralar analiz edilmiştir. Toplam flavonol ve toplam gallotannen verimleri SCW ekstralarında su-metanol ekstresinden önemli ölçüde daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Toplamda 49 bileşik tanımlanmıştır. Bunlar gallik asit ve türevleri, flavonoidler ve anakardik asitler olarak gruplandırılmıştır. SCW ekstralarında toplam 24 farklı gallik asit türevidir belirlenmiştir. SCW ekstralarının ana fenolik bileşen olarak gallik asit içerdiği (6.31-22.2 g/kg meyve kabuğu kuru ağırlığı), su-metanol ekstresinde ise β-glukogallin (4.39 g/kg meyve kabuğu kuru ağırlığı) ile galloil kinik asit (1.76 g/kg meyve kabuğu kuru ağırlığı) miktarının gallik asitten (1.68 g/kg meyve kabuğu kuru ağırlığı) yüksek olduğu rapor edilmiştir [14]. Asidik ekstraksiyon verimi ve esterleşme derecesi, pH (0.5-2.5), sıcaklık (50-90 °C), ekstraksiyon süresi (30-150 dakika) ve sıvı/katı oranı (10-50 v/w) şartlarında optimize edilerek incelenen antep fıstığı meyve kabuğu araştırmasında, pektin veriminin %7.31-19.02 ve esterleşme derecesinin %26-53.01 arasında değiştiği rapor edilmiştir. Pektin ekstraksiyon koşulunun optimizasyonunda optimal koşulun pH 0.5; 90 °C sıcaklık; 30 dakika; sıvı/katı oranı 50 v/w olduğu belirtilmiştir. Deneysel verim %22.1 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, optimal ekstraksiyon koşulu altında, pektinin galakturonik asit içeriği yaklaşık %65 olarak hesaplanmıştır [15]. 20 tane farklı genotipte (G1-G20) İran'da kültürü yapılan *P. vera* meyve kabuklarının toplam fenolik madde içeriğine hazırlanan metanol ekstresi ile bakılmıştır. 20 farklı genotipin toplam fenolik madde içeriğinin 5.34-35.69 mg/g (kuru numunenin gramı başına mg gallik asit eşdeğeri) arasında değiştiği rapor edilmiştir [16].

Diklorometan ve metanol ekstralarının fitokimyasal analizi yapılan antep fıstığı meyve kabuklarının, diklorometan ekstresinin GC-MS ile analizinde 100 g kuru meyve kabuklarının yağ asitlerinden miristik asit (6.54 mg), palmitik asit (144.43 mg), margarik asit (2.85 mg), stearik asit (39.06

mg), elaidik asit (22.88 mg), oleik asit (535.38 mg) ve linoleik asit (748.97 mg) yanında, anakardik asitler (3197.70 mg), fitosteroller (192.22 mg), karotenoitler (4.93 mg) ve tokoferoller (8.83 mg) de içerdiği belirtilmiştir. Metanol ekstresinin HPLC-ESI-IT-TOF-MS ile analizinde, ana fenolik maddelerin kersetin 3-*O*-glukozit, kersetin 3-*O*-galloilglukozit, kersetin 3-*O*-glukuronit, mirsetin 3-*O*-glukozit olduğu belirtilmiştir. Ayrıca 100 g kuru meyve kabuklarının içerdiği toplam fenolik madde (gallik asite eşdeğer) ve toplam flavonoit (kersetine eşdeğer) miktarları da sırasıyla, 4343.41 mg ve 345.34 mg olarak hesaplanmıştır [17]. *P. vera* meyvelerinin kabuklarından elde edilen uçucu yağ GC ve GC/MS ile incelenmiştir. α -pinen (%54.40) ana bileşen olmak üzere 54 bileşik tanımlanmıştır [18].

P. vera “Uzun” varyetesinin kuru yeşil ve kırmızı meyve kabuklarından hazırlanan metanol (%80) ekstralarının karşılaştırmalı HPLC-DAD-ESI-MS” ve HPLC-ESI-HR-MS analizinde toplamda 66 tane fenolik bileşik tespit edilmiştir. Bu maddeler gallotanenler, flavonoitler ve anakardik asitler olarak gruplandırılmıştır. Kırmızı meyve kabuklarının kuru yeşil meyve kabuklarından farklı olarak antosiyaninleri barındırdığı rapor edilmiştir [7]. *P. vera* “Uzun” ve “Ohadi” olmak üzere iki varyetesinin meyve kabuğunda fenolik bileşikler, toplam fenol içeriği ve uçucu bileşikler ölçülmüştür. Fenolik bileşik analizi için hazırlanan %75’lik metanol ekstraları LC-ESI-MS/MS ile analiz edilmiştir, ana fenolik bileşiğin gallik asit olduğu örneklerde 11 bileşik (gallik asit, protokateşik asit, kateşin, epikateşin, rutin, eriyodiktiyol 7-*O*-glukozit, naringin, luteolin, eriyodiktiyol, kersetin, naringenin) tanımlanmış ve miktarı saptanmıştır. “Uzun” ve “Ohadi” varyetelerinde sırasıyla, gallik asit (5505.33 ± 236.72 $\mu\text{g/kg}$; 4994.41 ± 214.75 $\mu\text{g/kg}$), protokateşik asit (207.07 ± 4.76 $\mu\text{g/kg}$; 206.68 ± 4.75 $\mu\text{g/kg}$), kateşin (1920.65 ± 32.65 $\mu\text{g/kg}$; 1892.46 ± 32.17 $\mu\text{g/kg}$), epikateşin (22.59 ± 0.67 $\mu\text{g/kg}$; 16.42 ± 0.49 $\mu\text{g/kg}$), rutin (428.87 ± 17.58 $\mu\text{g/kg}$; 424.85 ± 17.41 $\mu\text{g/kg}$), eriyodiktiyol 7-*O*-glukozit (1341.23 ± 57.67 $\mu\text{g/kg}$; 1326.23 ± 57.02 $\mu\text{g/kg}$), naringin (254.19 ± 5.84 $\mu\text{g/kg}$; 236.19 ± 5.43 $\mu\text{g/kg}$), luteolin (3.98 ± 0.06 $\mu\text{g/kg}$; 2.71 ± 0.04 $\mu\text{g/kg}$), eriyodiktiyol (149.99 ± 4.49 $\mu\text{g/kg}$; 96.95 ± 2.9 $\mu\text{g/kg}$), kersetin (169.44 ± 6.94 $\mu\text{g/kg}$; 169.34 ± 6.94 $\mu\text{g/kg}$), naringenin (119.15 ± 3.57 $\mu\text{g/kg}$; 115.86 ± 3.47 $\mu\text{g/kg}$) miktarlarında saptanmıştır. Toplam fenolik madde içeriği için Folin-*Ciocalteu* yöntemi kullanılmıştır, “Uzun” ve “Ohadi” varyetelerinde gallik asite eşdeğer olarak sırasıyla, 33.27 ± 0.03 mg/kg ve 31.43 ± 0.02 mg/kg olarak hesaplanmıştır. Meyve kabuğunun aromatik bileşimi diklorometan ile elde edilmiş ve GC-MS ile analiz edilmiştir. Terpenler, asitler, alkoller, fenoller ve benzenler dahil olmak üzere aromatik bileşikler, her iki varyetede tanımlanmıştır. Uçucu bileşiklerin toplam konsantrasyonu “Uzun” varyetesinde 13.7978 $\mu\text{g/kg}$, “Ohadi” varyetesinde ise 10.0216 $\mu\text{g/kg}$ olarak hesaplanmıştır. “Uzun” varyetesinde toplam 11 terpen, “Ohadi”de ise 10 terpen tanımlanmış ve miktarı belirlenmiştir. α -pinen, kamfen, γ -terpinen, α -terpinen ve limonen, her iki varyetenin ana bileşenleri olarak tespit edilmiştir. α -pinen (“Uzun”: 91.021 $\mu\text{g/kg}$; “Ohadi”: 54.002 $\mu\text{g/kg}$) her iki varyetenin ana bileşiği olarak belirlenmiştir [19]. “Uzun” (yeşil ve kırmızı), “Siirt” ve “Ohadi” varyetelerinden elde edilen ekstralar ile yapılan fitokimyasal çalışmada, metanol/su/formik asit (80/19/1, v/v/v) ile hazırlanan ekstraların

toplam fenolik içeriklerinin 61.2 ± 0.45 ile 100 ± 0.48 g/kg kuru bitki arasında değişiklik gösterdiği belirtilmiştir. Fenolik bileşikler arasında, anakardik asitler (toplam fenolik maddelerin %64.6-80.4'ü) baskın olup, ardından β -glukogallin, gallik asit ve penta-*O*-galloyil- β -D-glukoz ve flavonol glikozitleri (%5.7-16.3) gibi gallotanenlerin (%13.4-21.2) bulunduğu bildirilmiştir [20]. Farklı sanayi işleme yöntemleri uygulanarak hazırlanan *P. vera* "Ohadi" ve "Uzun" varyetelerinin meyve kabuklarından hazırlanan metanol ekstresinin LC-DAD-ESI-MS/MS analizinde 10 tanesi flavonoit ve ikisi fenolik asit olmak üzere toplam 12 fenolik bileşik tanımlanmıştır. Gallik asit, kateşin, eriyodiktiyol 7-*O*-glukozit ve eriyodiktiyol tüm ekstrelerin ana fenolik bileşikler olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar "Uzun" varyetesinin gallik asite eşdeğer olarak, toplam fenolik bileşik miktarının (11.46 mg/kg) "Ohadi" varyetesinden (10.55 mg/kg) daha yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca kavurma işlemi uygulanan ekstrelerin toplam fenolik madde içeriğinin kavurma işlemi görmemiş meyve kabuklarına oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [21].

P. vera "Bronte" varyetesinin taze kurutulmamış meyve kabuklarından hazırlanan metanol/su (2/1) ekstresinin, toplam flavonoit, toplam flavonol, toplam antosiyanin ve proantosiyanidin içeriği araştırılmıştır. Toplam flavonoit içeriği, kateşin eşdeğeri olarak g taze bitkide 70.27 mg, toplam flavonol içeriği, kersetin eşdeğeri olarak g taze bitkide 0.99 mg, toplam antosiyanin içeriği, siyanidin 3-*O*-glukozit eşdeğeri olarak g taze bitkide 4.86 mg, toplam proantosiyanidin içeriği, siyanidin klorit eşdeğeri olarak g taze bitkide 27.56 mg olarak hesaplanmıştır. Toplam fenolik madde içeriği ise Folin-*Ciocalteau* yöntemi kullanılarak g taze bitkide gallik asit eşdeğeri olarak 116.32 mg olarak hesaplanmıştır. Ekstrenin HPLC analizinde gallik asit (1453.31 μ g/g), siyanidin 3-*O*-galaktozit (5865.12 μ g/g), siyanidin 3-*O*-glukozit (32.56 μ g/g), kateşin (377.45 μ g/g), epikateşin (104.8 μ g/g), eriyodiktiyol (63.17 μ g/g), naringenin (11.44 μ g/g), eriyodiktiyol 7-*O*-glukozit (365.68 μ g/g), naringenin 7-*O*-neohesperidozit (118.82 μ g/g), kersetin (17.75 μ g/g), kemferol (0.95 μ g/g), kersetin 3-*O*-rutinozit (5.05 μ g/g), luteolin (18.97 μ g/g) tespit edilmiştir [22]. Aynı varyetenin meyve kabuklarından hazırlanan metanol/su (2/1) ekstresinin HPLC analizinde ise gallik asit (5703.22 μ g/g), siyanidin 3-*O*-galaktozit (16,439.32 μ g/g), siyanidin 3-*O*-glukozit (167.32 μ g/g), kateşin (1390.40 μ g/g), epikateşin (542.02 μ g/g), eriyodiktiyol (244.51 μ g/g), naringenin (57.99 μ g/g), eriyodiktiyol 7-*O*-glukozit (1120.66 μ g/g), naringenin 7-*O*-neohesperidozit (328.68 μ g/g), kersetin (71.15 μ g/g), kemferol (6.04 μ g/g), kersetin 3-*O*-rutinozit (28.53 μ g/g), luteolin (85.14 μ g/g) tespit edilmiştir, ayrıca Folin-*Ciocalteau* yöntemi ile yapılan toplam fenolik madde içeriği çalışmasında ise g ekstrede, gallik asite eşdeğer olarak 320.42 mmol olarak hesaplanmıştır [23]. Aynı varyete ile yapılan bir başka çalışmada metanol ekstresinin toplam fenolik madde içeriği (gallik aside eşdeğer), toplam flavonoit içeriği (kersetine eşdeğer) ve proantosiyanidin içeriği (siyanidin klorite eşdeğer), sırasıyla 11.7 ± 0.48 μ M, 0.688 ± 0.0197 mg/g, 0.177 ± 0.004 mg/g olarak, etanol ekstresinin ise, sırasıyla 6.74 ± 0.42 μ M, 0.341 ± 0.0062 mg/g, 0.088 ± 0.001 mg/g olarak hesaplanmıştır [8]. Metanol/su/asetik asit (70/29.5/0.5, v/v/v)

ile hazırlanan “Bronte” varyetesiine ait meyve kabuğu ekstresinin RP-HPLC-DAD analizinde siyanidin 3-O-galaktozit ve siyanidin 3-O-glukozit miktarları 100 g kuru bitki materyalinde, sırasıyla 2.55 mg ve 0.02 mg olarak hesaplanmıştır [24]. *P. vera* “Bronte” varyetesinin meyve kabuklarından elde edilen uçucu yağın analizi GC-MS ile yapılmış ve ana bileşenler 4-karen (%31.743), α -pinen (%23.584), d-limonen (%8.002) ve 3-karen (%7.731) olarak tespit edilmiştir [25].

P. vera'nın “Ahmad Aghaei” varyetesinin meyve kabuklarından hazırlanan sulu ekstresinin RP-HPLC-DAD ile analizinde ana bileşikler floroglukinol (26.20 ± 0.80 g/kg), gallik asit (9.40 ± 0.05 g/kg), naringin (1.40 ± 0.07 g/kg), vanilik asit (1.28 ± 0.08 g/kg), kateşin (1.20 ± 0.02 g/kg) ve protokateşik asit (0.30 ± 0.05 g/kg) olarak tespit edilmiştir [26].

P. vera “Fandoghi” meyve kabuğundan hazırlanan etil asetat, metanol ve su ekstrelerinden toplam fenolik madde içeriği tannik asite eşdeğer olarak kuru ağırlıkta en yüksek su ekstresi (34.7 mg/g) olarak tespit edilmiştir [27].

Antep Fıstığı Meyve Kabuğunun Biyolojik Aktivitesi

Antioksidan Aktivite

P. vera meyve kabuklarının 7 farklı etanol-su karışımı [100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 (v:v)] ile hazırlanan ekstrelerin antioksidan kapasiteleri DPPH, ORAC ve β -karoten ağartma testleri ile araştırılmıştır. DPPH testinde askorbik asite kıyasla, etanol konsantrasyonunun %40'a kadar yükselmesi ile ekstrelerin IC_{50} değerleri azalmıştır. Etanol konsantrasyonunda %70'den %100'e artış, ekstrelerin radikal süpürme aktivitesini önemli ölçüde düşürmüştür. Sonuçlar, %40 etanol ekstresinin en düşük IC_{50} değeriyle (0.70 ± 0.04 mg/ml) en iyi antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. DPPH testi kullanılarak, en yüksek IC_{50} değerine (2.73 ± 0.07 mg/ml) sahip %100 etanol için en az antioksidan aktivite elde edilmiştir. ORAC testinde %50 etanol ile elde edilen ekstrenin en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu (Trolox'a kıyasla) tespit edilmiştir (260.86 ± 6.01 μ mol TE/g ekstre). En düşük ORAC değeri %100 etanolden elde edilmiştir (51.80 ± 3.16 μ mol TE/g ekstre). β -karoten ağartma testinde etanol konsantrasyonunun %40'a kadar yükselmesi ile ekstrelerin antioksidan aktivitesi artmıştır. 5000 mg/l'de (96.88 ± 1.74) %40 etanol ekstresinin aktivitesi, 1250 mg/l'deki Tert-butilhidrokinon'a neredeyse eşdeğer olarak hesaplanmıştır [13]. İran'da kültürü yapılan 20 tane farklı genotipte (G1-G20) *P. vera* meyve kabuklarının antioksidan aktivitesi DPPH testi ile araştırılmıştır. 20 farklı genotipin meyve kabuklarından hazırlanan metanol ekstresinin radikal süpürücü potansiyelinin α -tokoferol'a kıyasla %68.5-90.87 arasında değiştiği hesap edilmiştir [16]. 110 ve 190 °C aralığında 6.9 MPa basınçta ve 4 ml/dakika akış hızında süperkritik su ekstraksiyonu (SCW) ve ultrasonik banyo ile metanol/su/formik asit (80/19/1, v/v/v) ekstresi hazırlanan antep fıstığı meyve kabuğu antioksidan kapasite çalışmasında ABTS, DPPH ve FRAP testleri uygulanmış, meyve kabuğu kuru ağırlığı Trolox'a oranla 0.68 ila 1.2 mmol/g arasındaki değerlerde kapasiteye sahip olduğu belirtilmiştir. Su-metanol ekstresi, SCW

ekstreleri için elde edilen değerlere kıyasla ($P<0.05$) en düşük antioksidan kapasite (0.47-0.51 mmol/g) göstermiştir [14].

P. vera “Uzun” ve “Ohadi” varyetelerinin meyve kabuğundan hazırlanan %75’lik metanol ekstreleri DPPH ve ABTS testleri kullanılarak antioksidan kapasiteleri test edilmiştir. “Uzun” ve “Ohadi” varyeteleri için DPPH testi sırasıyla 55.77 ± 0.02 mM Trolox/kg ve 52.35 ± 0.05 mM Trolox/kg olarak, ABTS testi için ise sırasıyla 52.65 ± 0.04 mM Trolox/kg ve 48.16 ± 0.03 mM Trolox/kg olarak hesaplanmıştır [19]. Aynı varyetelerin metanol ekstresi ile ABTS ve DPPH testleri kullanılarak yapılan antioksidan kapasite çalışmasında, Trolox’a oranla “Uzun” varyetesinin ekstrelerinin (ABTS: 28.28 mM/kg; DPPH: 13.58 mM/kg) “Ohadi” varyetesine (ABTS: 5.95 mM/kg; DPPH: 5.56 mM/kg) göre daha çok etkiye sahip olduğu, ayrıca kavurma işlemi gerçekleştirilen meyve kabuklarının ekstrelerinin kavurma işlemine tabi tutulmayan ekstrelerden daha fazla etkiye sahip olduğu belirtilmiştir [21].

P. vera, “Bronte” varyetesinin taze kurutulmamış meyve kabuklarından hazırlanan metanol/su (2/1) ekstresinin, antioksidan aktivitesi DPPH, trolox eşdeğeri antioksidan kapasite testi ve süperoksit dismutaz aktivite testi ile araştırılmıştır. DPPH testinde SE_{50} : 0.019 ± 0.001 mg, trolox eşdeğeri antioksidan kapasite testinde 2.19 ± 0.14 mmol (Trolox/g yaş meyve kabuğu) ve süperoksit dismutaz aktivite testinde ise IC_{50} : 0.25 ± 0.02 mg olarak hesaplanmıştır [22]. Aynı varyetenin meyve kabuklarından hazırlanan metanol/su (2/1) ekstresi demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü testi, β -karoten ağartma testi ve lipozomal membranlarda UV kaynaklı peroksidasyon testinde antioksidan kapasitesi araştırılmıştır. Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü testinde g ekstrede, askorbik asite eşdeğer olarak aktivitesi 2.69 ± 0.18 mmol, β -karoten ağartma testinde IC_{50} değeri 0.26 ± 0.02 mg/ml, lipozomal membranlarda UV kaynaklı peroksidasyon testinde ise IC_{50} değeri 2.49 ± 0.18 mg/ml olarak hesaplanmıştır [23].

Antimikrobiyal Aktivite

P. vera kurutulmamış ve kurutulmuş meyve kabuklarından soxhlet ekstraksiyonu ile hazırlanan *n*-hekzan ekstresinin antibakteriyel, antifungal ve antiviral aktivitesi test edilmiştir. Antibakteriyel aktivite *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Candida albicans* (ATCC 10231) ve *C. parapsilosis* (ATCC 22019)’in hem standart hem de izole suşlarına karşı mikrodilüsyon yöntemi ile taranmıştır. Vero hücre hattı kullanılarak ekstrelerin antiviral aktivitesinin belirlenmesi için hem *Herpes simplex* (DNA) hem de *Parainfluenza* virüsleri (RNA) kullanılmıştır. Kontrol ajanı olarak ampisilin, ofloksosin, ketokonazol, flukonazol, asiklovir ve oseltamivir seçilmiştir. Ekstreler, 128-256 μ g/ml konsantrasyonları arasında çok az antibakteriyel aktivite gösterirken, aynı konsantrasyonlarda belirgin antifungal aktivite göstermiştir. Bunun yanında ekstreler antiviral aktivite göstermemiştir [28].

P. vera “Bronte” varyetesinin meyve kabuklarından elde edilen uçucu yağın *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Escherichia coli* ATCC10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, *S. aureus*

MRSA ATCC43,300, *S. Aureus* 74CCH, *S. aureus* 7786, *S. aureus* 815 mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal aktivitesi çalışılmış ve *P. aeruginosa* ATCC9027 dışında uçucu yağın 7.11 mg/ml konsantrasyonda etkili olduğu belirlenmiştir [25].

Antienflamatuvar Aktivite

P. vera meyve kabuklarından hazırlanan diklorometan ekstresi-NP (2 g) ve bu ekstreden hekzan-etil asetat (1:1) ile elde edilen 10 alt fraksiyonun [NP1 (0.26 g), NP2 (0.57 g), NP3 (0.12 g), NP4 (0.10 g), NP5 (0.10 g), NP6 (0.05 g), NP7 (0.11 g), NP8 (0.02 g), NP9 (0.04 g), NP10 (0.02 g)] makrofaj hücreleri kullanılarak yapılan aktivite çalışmasında, ekstrenin lipopolisakkarit ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrik oksit (NO) ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) salınımını güçlü bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür. Antienflamatuvar sitokin COX-2'nin mRNA ekspresyon seviyeleri, NP2-NP5 fraksiyonları tarafından önemli ölçüde inhibe edilirken, IL-6 sadece NP3 fraksiyonu tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir. Ayrıca ekstre, makrofajlarda iltihaplanma tepkisi ile ilişkili mitokondriyal olmayan oksidatif tepkiyi önemli ölçüde azaltmıştır [17].

Anti-tirozinaz Aktivite

P. vera'nın "Ahmad Aghaei" varyetesinin meyve kabuklarından hazırlanan sulu ekstrenin anti-tirozinaz aktivitesi test edilmiş ve tirozinaz inhibitörü olarak bilinen askorbik asit ile karşılaştırılmıştır. Ekstrenin farklı konsantrasyonlarının (%0.05-0.80) ve askorbik asitin tirozinaz aktivitesi üzerindeki inhibe edici etkilerine bakılmıştır. Ekstre askorbik asite (IC₅₀: 0.3 g/L) oranla anti-tirozinaz (IC₅₀: 0.7 g/L) aktivite göstermiştir [26].

Antiprotozoal Aktivite

P. vera kurutulmamış ve kurutulmuş meyve kabuklarından soxhlet ekstraksiyonu ile hazırlanan *n*-hekzan ekstresinin 0.8 ve 4.8 µg/ml derişimlerde *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum*'a karşı, 9.7 ve 1.6 µg/ml derişimlerde ise *Trypanosoma cruzi*'ye karşı aktivitesi melarsoprol, benznidazol, miltefosin, artemisinin ve klorokin standartları kullanılarak test edilmiştir Kullanılan derişimlerde ekstrelerin antiprotozoal aktivitesine raslanmamıştır [29].

Anti-kanser Aktivite

P. vera meyve kabuklarından elde edilen hekzan, etil asetat, metanol ve su ekstrelerinin insan kolon kanseri (HT-29 ve HCT-116), meme adenokarsinomu (MCF-7), akciğer adenokarsinomu (H23), karaciğer hepatoselüler karsinomu (HepG2), servikal kanser (Ca Ski) ve normal fibroblast (BJ-5ta) hücreleri üzerine sitotoksik etkileri MTT hücre canlılık deneyi kullanılarak değerlendirilmiştir. Etil asetat ekstresi, 72 saat sonra MCF-7, HT-29 ve HCT-116'ya karşı sırasıyla 21.20±1.35, 23.00±1.2 ve 25.15±1.85 µg/ml'lik bir IC₅₀ değeriyle baskılayıcı bir etki göstermiştir. Morfolojik değerlendirme ve akış sitometrisi analizi, etil asetat ekstresinin apoptozu indüklemeye potansiyeli olduğunu ve en yüksek konsantrasyondaki etil asetat ekstresi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anjiyogenezin önemli ölçüde

inhibe edildiğini göstermiştir. Ayrıca Bax ekspresyonu artmış ve Bcl-2 ekspresyonu uygulamanın yapıldığı MCF-7 hücrelerinde azalmıştır [30].

Yara İyi Edici Aktivite

P. vera kabuklarının ham ekstresinin (MeOH %80), NIH/3T3 murin fibroblast hücreleri üzerinde çizme deneyi ile yara iyileştirme aktivitesini değerlendirmek için gerçekleştirilen çalışmada, fraksiyonlar/alt fraksiyonlar ve saf bileşik elde etmek için sıvı-sıvı partiyon, kolon kromatografisi, preparatif ince tabaka kromatografisi ve kristalleştirme kombinasyonu kullanılmıştır. İzole edilen bileşiğin yara iyileştirme potansiyeli, sırasıyla çizme deneyi ve CFSC seyreltme deneyi kullanılarak fibroblast göçü ve proliferasyonu ile incelenmiştir. Ek olarak, Real Time PCR kullanarak iyileşme sürecine dahil olan bazı inflamatuvar belirteçlerin gen ekspresyonunu değerlendirilmiştir. Aktif bileşiğin kimyasal yapısı spektrometrik yöntemlerle aydınlatılmıştır. CHCl₃ fraksiyonunun daha yüksek yara iyileştirme aktivitesi nedeniyle, aktif bileşiği vermek için ardışık kromatografik tekniklerle fraksiyonlara ayrılmış ve 3-Epimastikadiyenolik asit izole edilmiştir. Bu aktif bileşik (200 µg/ml), fibroblast proliferasyonunu ve göçünü önemli ölçüde artırarak çizik alanının yaklaşık %45 oranında azalmasına neden olmuştur. IL-6 ve TNF- α 'nın gen ekspresyonu üzerinde güçlü bir inhibitör etki ve aynı dozda NF- κ B gen ekspresyonu üzerinde bir stimülasyon etki göstermiştir [12].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Gıda olarak kullanılan ve büyük ekonomik öneme sahip olan Antep fıstığının (*Pistacia vera* L.) bir yan ürünü olan meyve kabukları çoğunlukla atık olarak kullanılmaktadır. Bu yan ürünün biyoaktif bileşiklerinin değerlendirilip ekonomiye katkı sağlayacak şekilde farklı ürünlere dönüştürülebilmesi büyük bir kazanım olarak görülmektedir. Yapılan fitokimyasal çalışmalar bitkinin meyve kabuklarının gallik asit ve türevleri, flavonoidler ve anakardik asitler içerdiğini göstermiştir. Ayrıca yapılan biyoaktivite çalışmaları Antep fıstığı meyve kabuklarının antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, anti-tirozinaz, anti-kanser ve yara iyi edici aktivitelerinin olduğunu göstermiştir. Bu derleme çalışması tarımsal gıda atığı olan Antep fıstığı meyve kabuklarından elde edilecek biyoaktif moleküllerin eczacılık alanında değerlendirilebilme potansiyelinin olduğunu göstermiştir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: *M.M.H.*; Tasarım: *M.M.H.*; Denetim: *M.M.H.*; Kaynaklar: *M.M.H.*; Literatür taraması: *M.M.H.*; Makalenin yazılması: *M.M.H.*; Kritik inceleme: *M.M.H.*; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

KAYNAKLAR

1. POWO. (2020). *POWO*. Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. <http://www.plantsoftheworldonline.org/> Erişim tarihi: 10.12.2020.
2. Yaltırık, F. (1967). *Pistacia* L. In P. H. Davis (Ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands Vol.2* (p. 546). Edinburgh University Press.
3. Tahtacı, S. A., Arpacı, S., Gözel, H., Bilim, C., Atlı, H. S., Tekin, H. (2007). Antepfıstığına çeşit seçimi. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü.
4. Barone, E., Padulosi, S., Van Mele, P. (1997). Descriptors for Pistachio (*Pistacia vera* L.). International Plant Genetic Resources Institute.
5. FAO. (2018). *The Food and Agriculture Organization*. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> Erişim tarihi: 10.12.2020.
6. TÜİK. (2019). *Türkiye İstatistik Kurumu*. <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=Tarim-111> Erişim tarihi: 10.12.2020.
7. Erşan, S., Güçlü Üstündağ, Ö., Carle, R., Schweiggert, R. M. (2016). Identification of phenolic compounds in red and green pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls (exo- and mesocarp) by HPLC-DAD-ESI-(HR)-MSⁿ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(26), 5334-5344. [CrossRef]
8. Barreca, D., Laganà, G., Leuzzi, U., Smeriglio, A., Trombetta, D., Bellocco, E. (2016). Evaluation of the nutraceutical, antioxidant and cytoprotective properties of ripe pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) hulls. *Food Chemistry*, 196, 493-502. [CrossRef]
9. FAO. (2013). *The Food and Agricultural Organization*. <http://www.fao.org/3/i3347e/i3347e.pdf> Erişim tarihi: 10.12.2020.
10. Carciochi, R. A., D'Alessandro, L. G., Vauchel, P., Rodriguez, M. M., Nolasco, S. M., Dimitrov, K. (2017). Valorization of Agrifood By-Products by Extracting Valuable Bioactive Compounds Using Green Processes, Academic Press, p. 191-228.
11. Seeram, N. P., Zhang, Y., Henning, S. M., Lee, R., Niu, Y., Lin, G., Heber, D. (2006). Pistachio skin phenolics are destroyed by bleaching resulting in reduced antioxidative capacities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7036-7040. [CrossRef]
12. Sarkhail, P., Navidpour, L., Rahimifard, M., Hosseini, N. M., Souri, E. (2020). Bioassay-guided fractionation and identification of wound healing active compound from *Pistacia vera* L. hull extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 248, 112335. [CrossRef]
13. Özbek, H. N., Halahlıh, F., Göğüş, F., Koçak Yanık, D., Azaizeh, H. (2020). Pistachio (*Pistacia*

- vera* L.) Hull as a Potential Source of Phenolic Compounds: Evaluation of Ethanol–Water Binary Solvent Extraction on Antioxidant Activity and Phenolic Content of Pistachio Hull Extracts. *Waste and Biomass Valorization*, 11(5), 2101-2110. [CrossRef]
14. Erşan, S., Güçlü Üstündağ, Ö., Carle, R., Schweiggert, R. M. (2018). Subcritical water extraction of phenolic and antioxidant constituents from pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls. *Food Chemistry*, 253, 46-54. [CrossRef]
 15. Chaharbaghi, E., Khodaiyan, F., Hosseini, S. S. (2017). Optimization of pectin extraction from pistachio green hull as a new source. *Carbohydrate Polymers*, 173, 107-113. [CrossRef]
 16. Aliakbarkhani, S. T., Farajpour, M., Asadian, A. H., Aalifar, M., Ahmadi, S., Akbari, M. (2017). Variation of nutrients and antioxidant activity in seed and exocarp layer of some Persian pistachio genotypes. *Annals of Agricultural Sciences*, 62(1), 39-44. [CrossRef]
 17. Grace, M. H., Esposito, D., Timmers, M. A., Xiong, J., Yousef, G., Komarnytsky, S., Lila, M. A. (2016). Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties of pistachio hull extracts. *Food Chemistry*, 210, 85-95. [CrossRef]
 18. Küsmenoglu, S., Baser, K. H. C., Özek, T. (1995). Constituents of the essential oil from the hulls of *Pistacia vera* L. *Journal of Essential Oil Research*, 7(4), 441-442. [CrossRef]
 19. Sonmezdag, A. S., Kelebek, H., Selli, S. (2017). Characterization and comparative evaluation of volatile, phenolic and antioxidant properties of pistachio (*Pistacia vera* L.) hull. *Journal of Essential Oil Research*, 29(3), 262-270. [CrossRef]
 20. Erşan, S., Güçlü Üstündağ, Ö., Carle, R., Schweiggert, R. M. (2017). Determination of pistachio (*Pistacia vera* L.) hull (exo- and mesocarp) phenolics by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ and UHPLC-DAD-ELSD after ultrasound-assisted extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62, 103-114. [CrossRef]
 21. Sonmezdag, A. S., Kelebek, H., Selli, S. (2019). Effect of hulling methods and roasting treatment on phenolic compounds and physicochemical properties of cultivars ‘Ohadi’ and ‘Uzun’ pistachios (*Pistacia vera* L.). *Food Chemistry*, 272, 418-426. [CrossRef]
 22. Tomaino, A., Martorana, M., Arcoraci, T., Monteleone, D., Giovinazzo, C., Saija, A. (2010). Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seeds and skins. *Biochimie*, 92(9), 1115-1122. [CrossRef]
 23. Martorana, M., Arcoraci, T., Rizza, L., Cristani, M., Bonina, F. P., Saija, A., Trombetta, D., Tomaino, A. (2013). In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effect of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seed and skin extracts. *Fitoterapia*, 85, 41-48. [CrossRef]
 24. Bellocco, E., Barreca, D., Laganà, G., Calderaro, A., El Lekhlifi, Z., Chebaibi, S., Smeriglio, A., Trombetta, D. (2016). Cyanidin-3-*O*-galactoside in ripe pistachio (*Pistachia vera* L. variety Bronte) hulls: Identification and evaluation of its antioxidant and cytoprotective activities. *Journal of Functional Foods*, 27, 376-385. [CrossRef]
 25. Smeriglio, A., Denaro, M., Barreca, D., Calderaro, A., Bisignano, C., Ginestra, G., Bellocco, E., Trombetta, D. (2017). In vitro evaluation of the antioxidant, cytoprotective, and antimicrobial properties of essential oil from *Pistacia vera* L. Variety Bronte Hull. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1212. [CrossRef]

26. Fattahifar, E., Barzegar, M., Ahmadi Gavlighi, H., Sahari, M. A. (2018). Evaluation of the inhibitory effect of pistachio (*Pistacia vera* L.) green hull aqueous extract on mushroom tyrosinase activity and its application as a button mushroom postharvest anti-browning agent. *Postharvest Biology and Technology*, 145, 157-165. [\[CrossRef\]](#)
27. Goli, A. H., Barzegar, M., Sahari, M. A. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistacia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, 92(3), 521-525. [\[CrossRef\]](#)
28. Özçelik, B., Aslan, M., Orhan, I., Karaoglu, T. (2005). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophylic extracts of *Pistacia vera*. *Microbiological Research*, 160(2), 159-164. [\[CrossRef\]](#)
29. Orhan, I., Aslan, M., Sener, B., Kaiser, M., Tasdemir, D. (2006). In vitro antiprotozoal activity of the lipophilic extracts of different parts of Turkish *Pistacia vera* L. *Phytomedicine*, 13(9-10), 735-739. [\[CrossRef\]](#)
30. Seifaddinipour, M., Farghadani, R., Namvar, F., Mohamad, J., Kadir, H. A. (2018). Cytotoxic effects and anti-angiogenesis potential of pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls against MCF-7 human breast cancer cells. *Molecules*, 23(1), 110. [\[CrossRef\]](#)



1,2,4-TRIAZOLE DERIVATIVES IN MEDICINE AND PHARMACY AND APPLICATION PROSPECTS

TIP VE ECZACILIK ALANINDAKİ 1,2,4-TRİAZOL TÜREVLERİ VE UYGULAMA
ÖNERİLERİ

Yurii G. SAMELIUK^{1,*} , Fadi AL ZEDAN² , Tetyana M. KAPLAUSHENKO³ 

¹Zaporizhzhia State Medical University, Faculty of Pharmacy, Department of Physical and Colloidal
Chemistry, 69000, Ukraine

²Zaporizhzhia State Medical University, Faculty of Pharmacy, Drug Technology Department, 69000,
Ukraine

³Zaporizhzhia State Medical University, Medical College, 69000, Ukraine

ABSTRACT

Objective: Development of methods for the synthesis, studies of chemical, physico-chemical and biological properties of 1,2,4-triazole derivatives, in particular compounds with heterocyclic scaffolds and complex compounds as potential biologically active substances.

Result and Discussion: In this review, 40 scientific papers reporting the properties of 1,2,4-triazole derivatives were evaluated. Each class of compounds described in the review was reported with the prospect of forming the direction for further research. Because of there is no enough studies about biological action of 1,2,4-triazole derivatives in human, it encourages further research.

Keywords: Biological activity, bibliosemantic method, organic synthesis, 1,2,4-triazole

ÖZ

Amaç: 1,2,4-triazol türevlerinin, özellikle heterosiklik iskelete sahip ve biyolojik olarak aktif bileşiklerin, sentezi, kimyasal, fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerinin incelenmesi için yöntemlerin geliştirilmesi.

Sonuç ve Tartışma: Bu derlemede, 1,2,4-triazol türevlerinin özelliklerinin bildirildiği 40 bilimsel makale değerlendirilmiştir. Verilen her bileşik sınıfı gelecekteki çalışmalara yön verecek şekilde bildirilmiştir. 1,2,4-triazol türevlerinin insandaki biyolojik etkileri hakkında yeterli çalışma olmaması, bu alanda daha fazla çalışma yapılmasını teşvik etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyolojik aktivite, bibliyosemantik yöntem, organik sentez 1,2,4-triazol

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Yurii Sameliuk
e-mail / e-posta: sameluk_yurii@ukr.net, **Phone / Tel.:** +38 066 424 12 04

INTRODUCTION

Modern world pharmaceutical science is based on the following main areas: search for new original drugs (including synthesis of biologically active compounds and their biological screening), manufacture (selection and development of dosage form, development of production methods), standardization (development of quality control methods for the substance), preclinical and clinical trials. Also one of the main directions is marketing research. All of the above allow the introduction of new original drugs in general pharmaceutical and medical practice.

To implement the project of drug development, first of all it is necessary to determine the matrix for further stages of implementation. It is for this purpose that we conducted this literature review.

The synthetic school of 1,2,4-triazole derivatives was created by Professor of Zaporizhzhia State Medical University Yevhen Hryhorovych Knysch. He has developed and introduced many drugs derived from 1,2,4-triazole into medical, pharmaceutical and veterinary practice. As followers of the school of triazoles under the leadership of Professor of Zaporizhzhia State Medical University Kaplaushenko Andriy Hryhorovych, scientists of the Department of physical and colloidal chemistry carry out research in this synthetic direction.

This review aims to systematize the literary data on 1,2,4-triazole derivatives and to determine the further vector of scientific studies.

Today, 1,2,4-triazoles synthesized by scientists of Zaporizhzhia State Medical University are considered promising research directions. This is justified by the simplicity of synthesis, the availability of reagents, high biological activity and low molecular toxicity.

Also, the modern pharmaceutical and medical community pays considerable attention to coordination complexes, as the processes of coordination, dissociation of complexes and intercomplex rearrangement are important in the biological processes of the organism. That is why highly effective mono- and disubstituted 1,2,4-triazoles at the 4th and 5th positions of the nucleus were chosen as objects of the research. The article is also considered promising options for obtaining coordination compounds based on 1,2,4-triazoles, which in the future will allow to obtain new highly efficient biologically active complexes. According to the authors, the analysis will allow to combine bioactive fragments of triazoles into coordination structures, which may have a greater biopotential.

We reviewed 40 scientific papers for a more detailed look at the triazole research aspects. The review includes the results of scientific works which describe molecules that are not difficult to obtain, have high results of biological action, and recommended by the authors for further research.

RESULT AND DISCUSSION

Synthesis and Some Pharmacological Properties of 1,2,4-triazole Derivatives

Scientists [1] synthesized a series of five-membered heterocyclic systems (Fig. 1) containing three heteroatoms from the parent compound (Felbinac) [1]. When designing the molecules of the starting compounds, the aromatic structure of biologically active compound (hereinafter BAC) of Felbinac was preserved. The carboxy group was synthetically converted to the nucleus of 1,2,4-triazole and further modified to create anti-inflammatory compounds drugs. Biological activity was studied in laboratory animals. The carrageenan model was chosen to determine the anti-inflammatory effect. The biological effect of the synthesized compounds was compared with ibuprofen and yield matrix after 120 minutes and 180 minutes. The test compounds showed excellent anti-inflammatory activity. Low rates of acute toxicity of compounds are a prospect for further research.

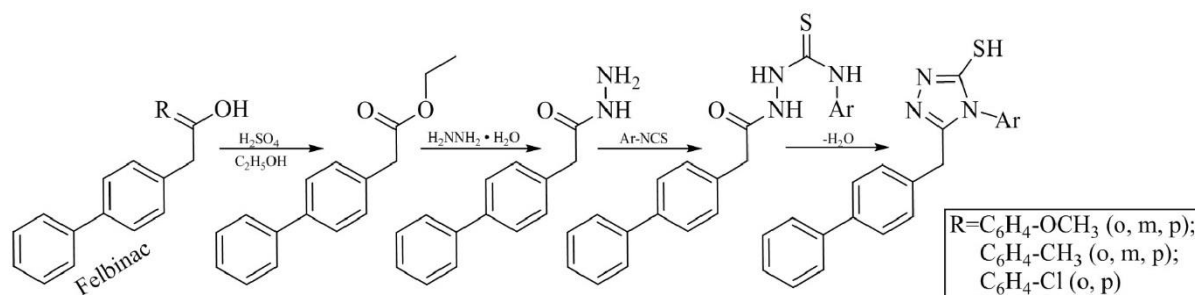


Figure 1. Synthesis 1,2,4-triazole derivatives of Felbinac [1]

In the study conducted by the authors [2], a series of new systems with condensed heterocycles were synthesized. The compounds were synthesized from the initial 4-(4-X-phenylsulfonyl)phenyl)-4H-1,2,4-triazol-3-thiols (Fig. 2, where X= H, Cl, Br).

To synthesize a series of new compounds, the initial triazoles were subjected to interaction, in the presence of ethanoic acid and its anhydride, with 4-fluorobenzaldehyde, α -chloroethane acid, and sodium acetate.

The corresponding ethanones were obtained by treating the initial triazoles with 2-bromo-4'-fluoroacetophenone. Cyclic forms of 1,2,4 triazoles (at the 3 and 2 positions of the heterocyclic nucleus) were obtained by cyclizing S-alkylated 1,2,4-triazoles in H_2SO_4 medium, at 0 °C.

The composition of the synthesized compounds was confirmed by elemental analysis. The structure was confirmed by mass spectrometry, IR, 1H (^{13}C)-NMR. The synthesized compounds demonstrated antimicrobial and antifungal activity [2].

The scientific publication of authors [3] (Fig. 3) describes the synthesis of new S-substituted 1H-3-R-5-thio-1,2,4-triazoles on cancer cells of the HT29 line. Among all synthesized structures, 55.7 TZ was developed as a possible inhibitor of phospholipid-dependent kinase 1, which exhibits significant cytotoxic activity against HT29. 55.7 TZ cells along with two other BACs (ciphers 53.7 TZ and 3A.7

TZ), led to a significant delay in the cell cycle. This study reveals the prospects for the development of new agents containing a 5-thio-1,2,4-triazole framework with antiproliferative activity.

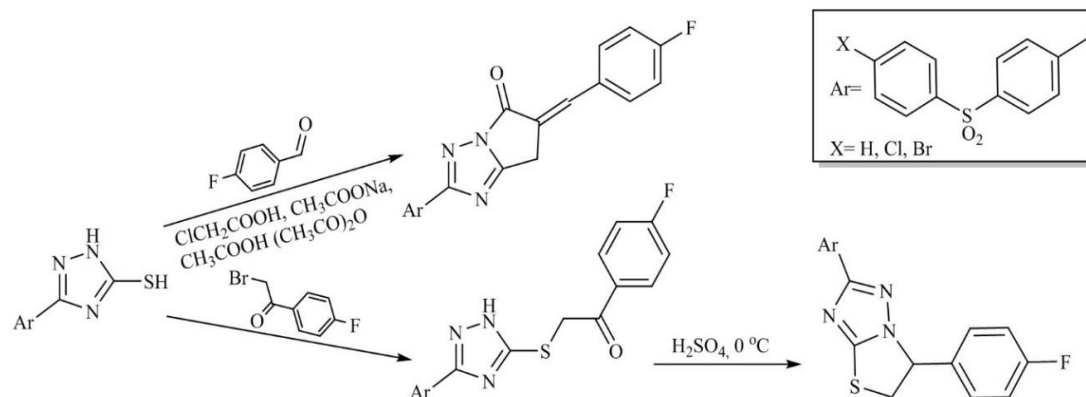


Figure 2. Synthesis scheme of cyclocondensation of 3-thio-1,2,4-triazoles [2]

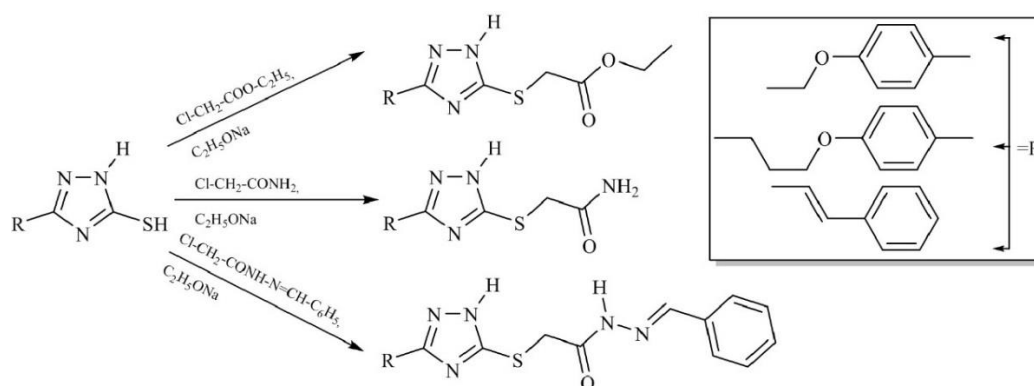


Figure 3. Modification of 1,2,4-triazoles at the S-position [3]

Bacterial resistance to antimicrobials requires new antimicrobial BACs that are more effective and less toxic [4]. Triazole and thiazole derivatives are considered the key matrices in medical chemistry. The derivatives of 1,2,4-triazole synthesized by the researchers [4] (Fig. 4) showed an effect similar to ciprofloxacin. Antimicrobial enhancement is also expressed in some compounds against *Listeria monocytogenes*. Derivatives have pronounced minimum inhibitory concentration (MIC) values. Compounds with fluorophenyl, bromophenyl, nitrophenyl, and methoxyphenyl substituents strongly inhibited growth of *Pseudomonas aeruginosa*. The synthesized BACs were screened *in silico* for their absorption, distributive, metabolic, elimination, and toxicity properties. Based on the results of virtual screening, the authors [4] concluded that thiazolyl-triazole derivatives with a hydroxyphenyl substitute is the best candidate for a leader compound that exceeds the action of ciprofloxacin [4].

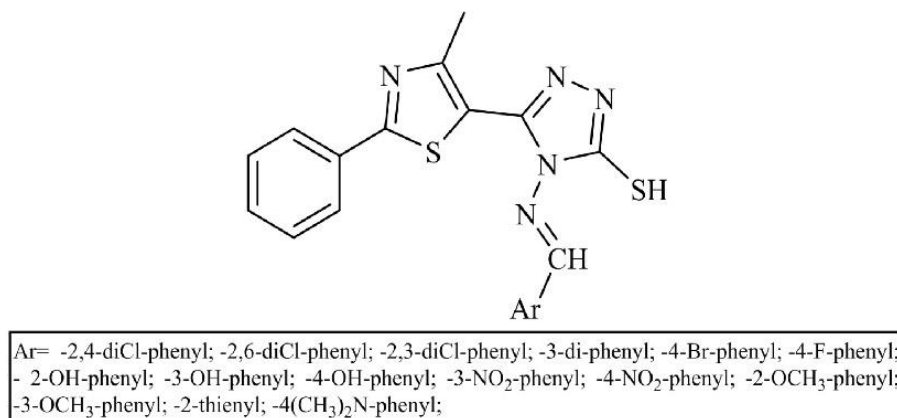


Figure 4. Structures of new thiazolyltriazole Schiff bases [4]

The authors [5] showed that $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ or ZrCl_4 catalyzed the opening of the nucleophilic ring of dicyanooxyrans together with 5-thio-1,2,4-triazole-3-phenyl. The catalysts are inexpensive, highly efficient, and can be used repeatedly (Fig. 5). This study is promising for further identification of biologically active agents, since the combination of several electron-donor groups in one structure at the same time can lead to an increase in the cytoprotective effect.

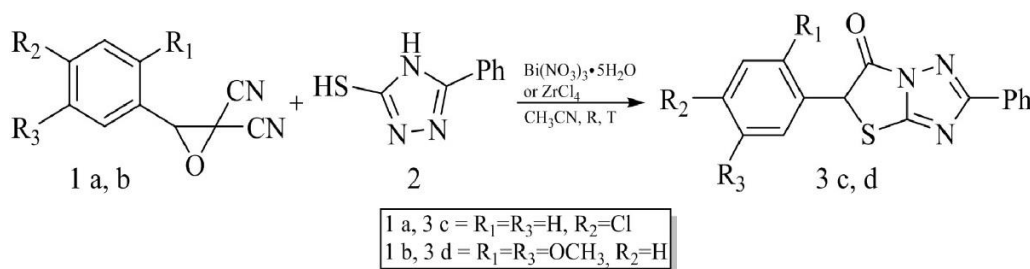


Figure 5. Condensation reaction of 5-mercapto-3-phenyl-4*H*-1,2,4-triazole [5]

The therapeutic use of 1,2,4-triazole prompted the authors [6] to create new BACs. Two series of *S*-substituted derivatives were synthesized and their biological potential was evaluated. The initial thiol was transformed by the action of an alkyl halide in a neutral solvent (Fig. 6). Intermediate electron acceptors were synthesized by the interaction of *N*-substituted alkyl/arylamines and 2-bromoacetyl bromide under dynamic pH control. The structures were established using IR, EIMS, ¹H, and ¹³C NMR spectral methods. Most of the synthesized derivatives were found to be potent inhibitors of the enzyme glucosidase and are even better than the commercial analog of acarbose.

Targeted changes in the structure significantly affected the results of bioactivity. Synthesized BACs can be considered for drug development programs for the treatment of type II diabetes.

The authors [7] synthesized a new matrix based on 1,3-bi-1,2,4-triazole-5,5-diamine (Fig 7.). The synthesized compound is characterized by various analysis methods, such as IR, NMR spectrometry, and HPLC [7].

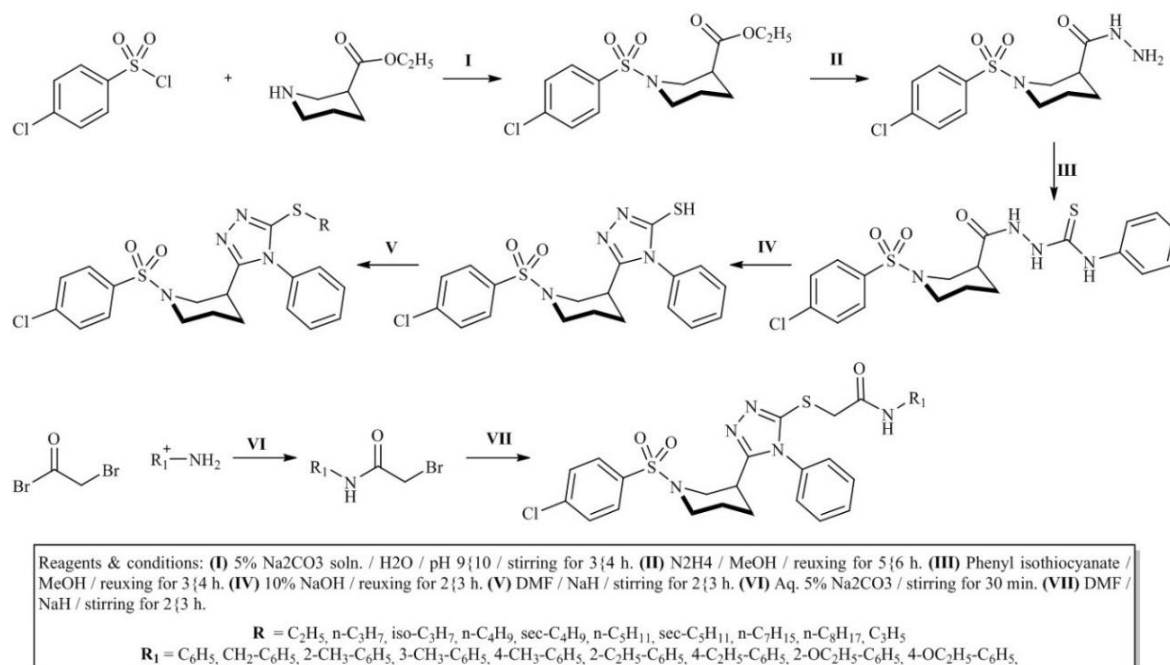


Figure 6. Synthesis of S-substituted derivatives of 5-thio-3-Ar-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole [6]

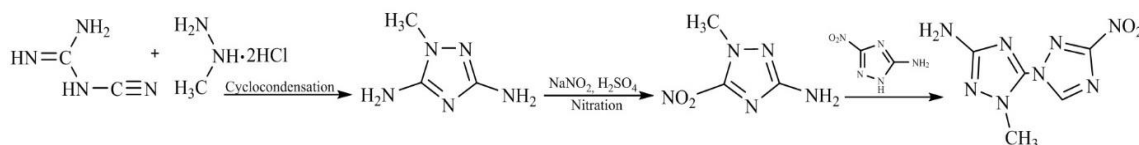


Figure 7. Synthetic route to 1,3-bi-1,2,4-triazole-5,5-diamine derivatives [7]

Taking into account that the scientific work was aimed at studying the energy properties of the molecule, it should be noted that its biological potential remains appropriate.

Due to the simple synthesis of available reagents and potentially biologically active functional groups of the molecule combined with two 1,2,4-triazole cycles, this compound and its synthetic analogues can be recommended for further pharmacological screening.

The authors [8] also developed and synthesized a series of derivatives of the 1,2,4-triazole heterocyclic system (Fig. 8). Their structures were proved using modern analytical methods. Biological effects (antimicrobial/antifungal) were evaluated *in vitro*. A BAC with a methoxyphenyl substitute in position 5 and a chlorophenyl fragment showed the highest activity [8].

Compounds that had a methoxyphenyl fragment showed the most powerful activity against *Staphylococcus aureus*. Synthesized BACs showed an antifungal effect against *Candida albicans*. Studies also showed that they can act as inhibitors of *Mycobacterium fortuitum*. The synthesized compounds can be useful as medium-to-high-level disinfectants or antiseptics. They are non-toxic to the skin/mucous membranes.

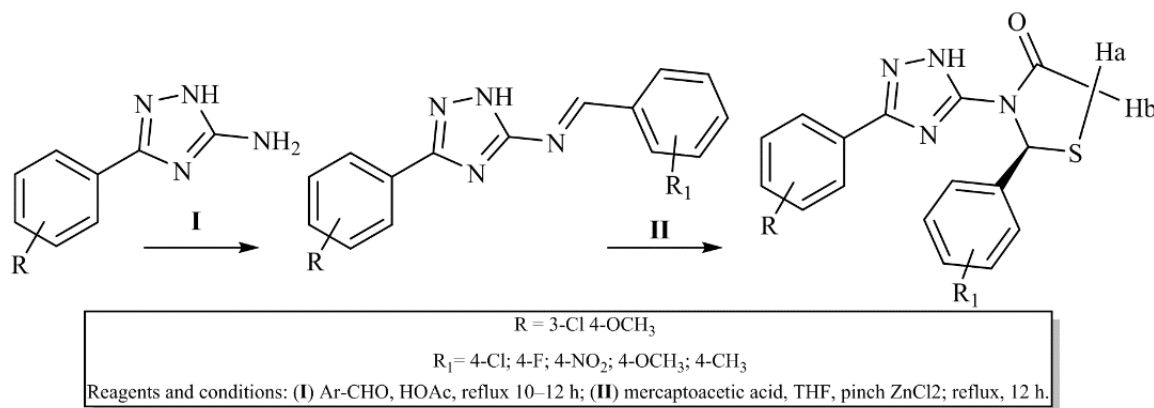


Figure 8. Synthesis of some new 4-thiazolidinones [8]

The conducted studies of scientists [9] indicate the prospects for using 1,2,4-triazole derivatives as excipients in the manufacture of dosage forms. The authors synthesized a series of 1,2,4-triazoles with a 3,4,5-trimethoxyphenyl radical and substituents in position 4 (Fig. 9). The structure is confirmed by a complex of modern analytical methods. Prospects for further research for scientists [9] are the high antimicrobial and antifungal effects of ylidenedhydrazides in combination with the 1,2,4-triazole core.

The scientific work of the author [10] confirms the relevance of the direction. High rates of antimicrobial and antifungal activity in compounds with 1,2,4-triazole nucleus and 3,4,5-trimethoxyphenyl substituent are shown. Therefore, compounds in scientific work [9] are relevant in terms of finding BAC.

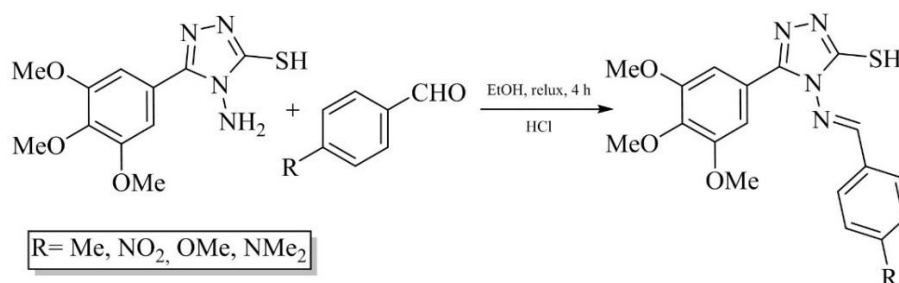


Figure 9. Synthesis of of 1,2,4-triazoles with a 3,4,5-trimethoxyphenyl radical and substituents in position 4 [9]

The authors [11] developed and created a number of new myrtenal derivatives with a 1,2,4-triazole core (Fig. 10). The derivatives were synthesized by multi-stage reactions to produce powerful BACs. The structures of compounds were confirmed using modern analytical approaches.

The antifungal activity of synthesized BACs against various strains of pathogenic fungi was evaluated for compounds taken at a dose of 50 g/ml. Compounds with isopropyl, ethyl, and ortho-nitrophenyl radicals (Fig. 10.) showed activity with an inhibition rate of more than 96.3% against *Physalospora piricola*. Azoxystrobin showed less activity than the synthesized compounds [11]. Inhibition of the control group was no more than 96.0% [11].

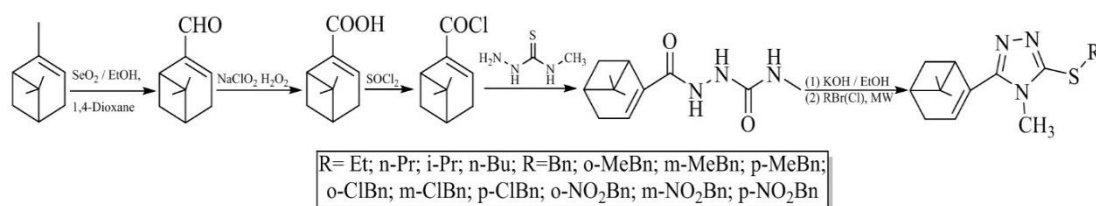


Figure 10. Synthesis of thioethers based on 5-R-4-methyl-1,2,4-triazole [11]

Scientists [12] paid great attention to the synthesis of 3-thio-1,2,4-triazoles with subsequent conversion to the corresponding S-glucosides. The compounds were created by combining *D*-glucose with thiogroups of 3-thio-4-*R*-5(2'-aminophenyl)-1,2,4-triazoles (Fig. 11). The structure of the compounds was determined by IR, UV, and ¹H,¹³C-NMR spectrometry. The initial compounds and the S-glycoside representative were tested in vitro for Gram-positive and Gram-negative bacteria [12]. They showed considerable activity. Amikacin was used as a standard.

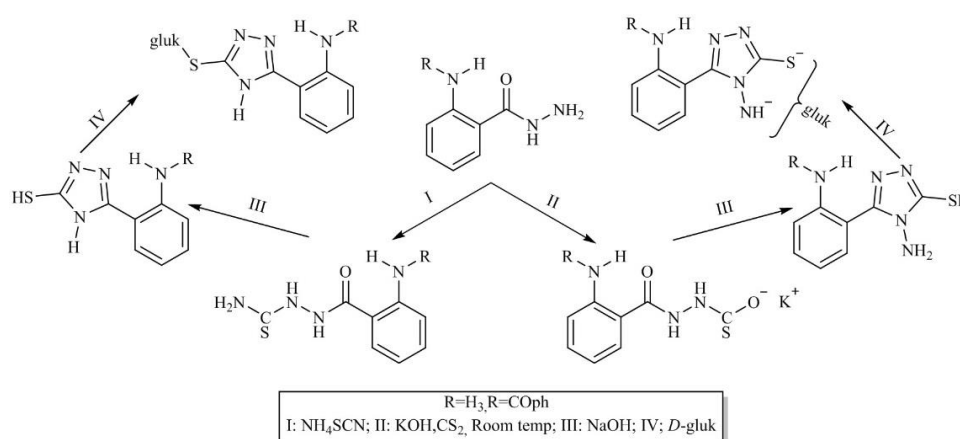


Figure 11. Synthesis of N- and S-triazologlycosides [12]

The study by scientists [13] describes the synthesis and study of 3-hydroxy-2-naphtholine hydrazone derivatives (Fig. 12). Thiosemicarbazide derivatives were synthesized by the interaction of 3-

hydroxy-2-naphthoid hydrazide and the corresponding isothiocyanates. Thiones were synthesized by Alkaline cyclization of the corresponding thiosemicarbazides in an alkaline medium. ^1H , ^{13}C -NMR spectrometric analysis established the structure of the BAC. Antimicrobial screening showed a high antibacterial effect against gram-positive bacteria. Cefuroxime was half as active as synthesized BACs. Ampicillin was 4 times less active than the synthesized analogues [13].

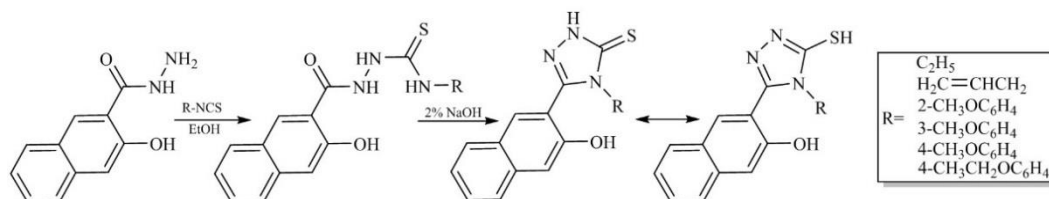


Figure 12. Synthesis scheme of naphthoid-1,2,4-triazole compounds [13]

3-Thio-1,2,4-triazole derivatives attracted attention of the scientists [14] due to their perspective in biological research. Alkylthio-1,2,4-triazoles have three nucleophilic centers ready to react with electron-acceptors. Thus, isomeric forms of benzylsulfanyl-1,2,4-triazole were synthesized with various dihaloalkanes (Fig. 13). Regional selectivity was determined by X-ray crystallography and NMR.

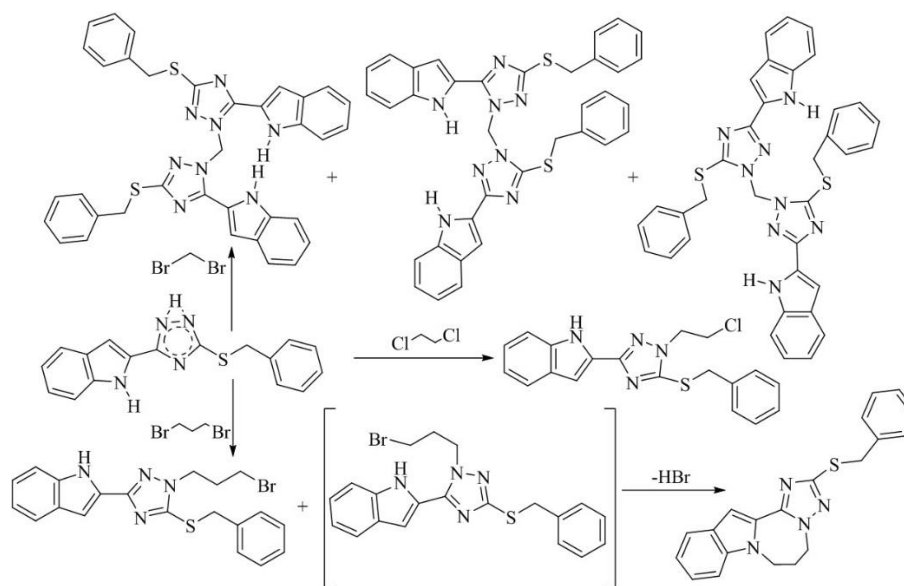


Figure 13. Products obtained from reaction of dihaloalkanes and 1,2,4-triazole derivatives [14]

When S-substituted forms of thiothiazoles interact with various alkylating agents, only N1 and N2 attack electron-acceptor carbon atoms. Mainly molecules with the participation of N2 atoms are formed.

In a study [15], a number of new derivatives of hydrazone and 1,2,4-triazole sulfonamide were synthesized. Initially, the authors treated 3-thio-1,2,4-triazoles with ethyl acetate to obtain thioethers, which were subsequently converted to hydrazides by a hydrogenolysis reaction. The synthesized

hydrazides were converted into the formula of the corresponding sulfonamides and hydrazones. The structure of the synthesized compounds was characterized by ¹H, ¹³C-NMR spectrometry. Elemental composition was established by elemental analysis.

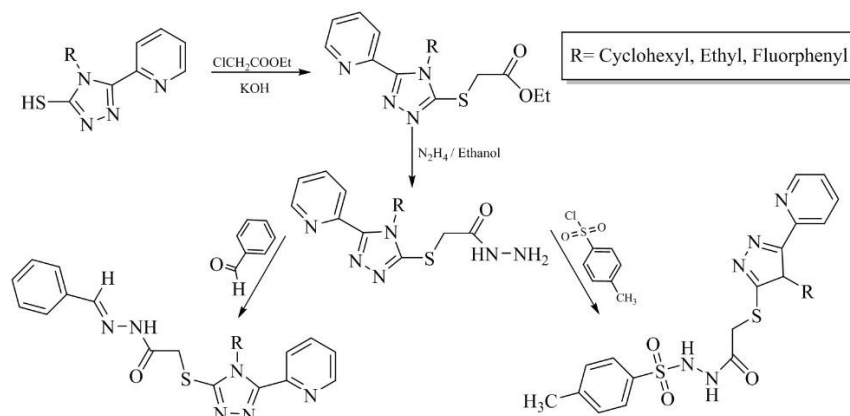


Figure 14. Synthesis of derivatives 1,2,4-triazole, transformed to hydrazones and sulphonamides [15]

In addition, the anticoagulant effect was studied for synthesized BACs. Synthesized compounds increased the time of plasma rectification and bleeding. Screening of synthesized compounds proves that this matrix can be used in medical practice for more detailed research.

The authors [16] reported the synthesis of new derivatives of 1,2,4-triazole with benzodioxane in the fifth position. The desired amidomethylthio derivatives were synthesized by replacing the potassium salt of triazolotyol with various primary arylalkylamines [16] (Fig. 15).

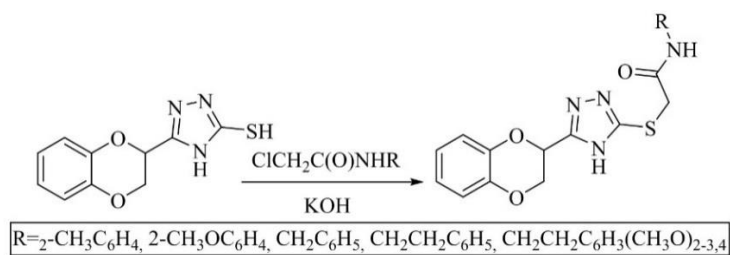


Figure 15. Transformation of 1,4-benzodioxanyl-1,2,4-triazoles [16]

According to the authors [16], derivatives of 5-(1,4-benzodioxanyl)-1,2,4-triazole-3-thiol have antitumor effects. The compounds also showed antimicrobial and antiviral effects. The authors also synthesized triheterocyclic compounds (Fig. 16). The individuality and structure were proved by modern analytical methods.

The authors [17] synthesized a number of compounds based on 1,2,4-triazole, combining heterocyclic systems of benzofuran, pyrazole and quinoline (Fig. 17). The elemental composition of the synthesized BACs was determined by elemental analysis. ¹H, ¹³C-NMR spectrometry allowed to

establish the structure which was finally confirmed by mass spectrometry. Antimicrobial action indicators were established for synthesized BACs. Chloramphenicol, as a standard, showed the worst result.

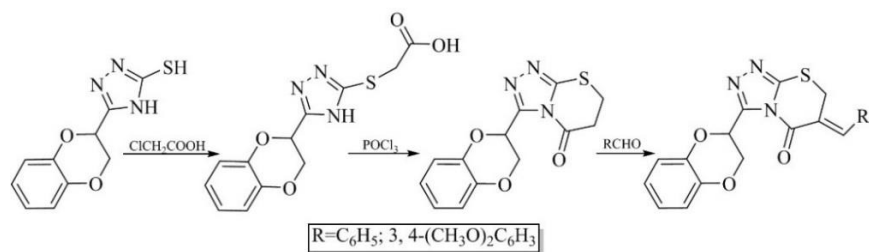


Figure 16. Obtaining triheterocyclic structures, 1,2,4-triazole derivatives [16]

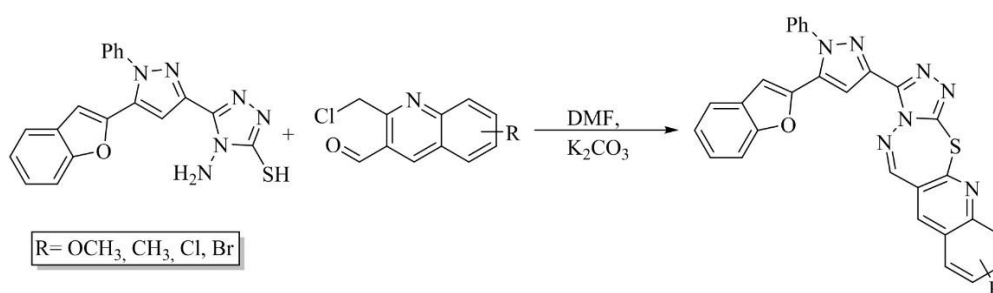


Figure 17. Synthesis of compounds based on 1,2,4-triazole, combining heterocyclic systems of benzofuran, pyrazole and quinoline [17]

Review of Complex Formation of 1,2,4-triazole Derivatives and Prospects for Their Application

Scientists [18] investigated five new complex compounds based on the heterocyclic system of 1,2,4-triazole and palladium. Enantiomeric pairs turned out to be anti-cancer agents. Antiproliferative properties were inherent in all synthesized complexes. In particular, this was expressed in the deactivation of MCF7 cells. The study revealed that the enantiomers of all synthesized complexes show almost the same activity, which indicates the absence of the effect of chirality on their antiproliferative activity. It is important to emphasize that the compounds show very low toxicity to non-cancerous cell lines.[18].

The authors [19] synthesized two complexes with complexing agent Cu (II). Scientists [19] used Azocenol as a ligand of complex. All complexes show greater activity for the inhibition of fungi than the Azocenol, which indicates the potential use of these complexes as antifungal agents. In addition, the complex of Cu(II), [CuL₄ · (H₂)₂] · 2NO₃ · 2CH₃OH · has a stronger antifungal activity than [CuL₂ · (CH₃COO⁻)₂] [19].

In studies [20], a water-soluble diamino-1,2,4-triazole complex with complex ion Cu (II) was obtained, corresponding to the structure indicated in Figure 18. The Cu-triazole complex in solution is very unstable. The structure of the complex compound depends on the exact state of the reaction. It is

important to note that copper chelate complexes are important because they can be used to increase the formation of collagen and connective tissues of the skin, bones and cartilages.

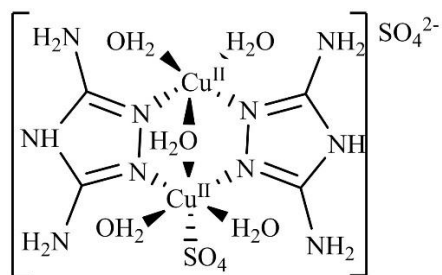


Figure 18. The structure of diamino-1,2,4-triazole complex with complex ion Cu (II) [20]

Continuing the study of complex compounds [21], the authors investigated new Anderson-type polyoxometalates and organometallic complexes based on octamolybdates with triazole ligands. The basis for the creation of complexes included a combination with Co (II). Theoretically, these compounds can be used to enhance the synthesis of vitamin B12 in the human body.

The researchers [22] proposed two coordination complexes Fe [22] (Fig. 19), which combine two different types of ligands.

From the point of view of researches of these complexes on biological activity, it is possible to note with confidence that they have a great potential, considering redox processes of an organism.

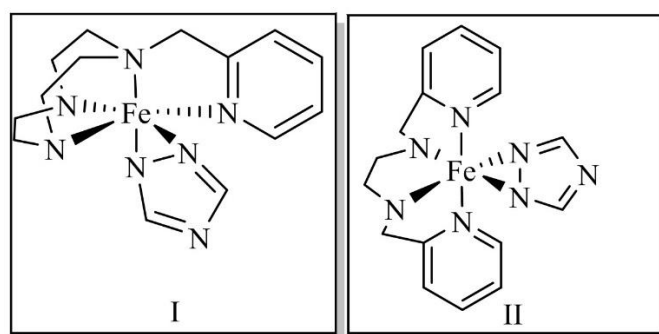


Figure 19. Structures of the Fe complex with 1,2,4-triazole ligands [22]

Researchers [23] studied the adsorption of alkylthio derivatives of 1,2,4-triazole on the surface of metal plates, which led to the formation of complex compounds. Interpolating research into the medical and pharmaceutical fields, it should be noted that these compounds, due to their anticorrosive effect, may be useful because they can affect the oxidative function.

Complexes obtained by the authors [24] (Fig. 20) can be a promising material for the study of biological properties of 1,2,4-triazole compounds.

A series of metal complexes of Lanthanum and Thorium were synthesized by the authors [25] using 1,2,4-triazole ligands. Ligands were created by condensation of 1,2,4-triazole and coumarin derivatives. The structure of the complexes was proved by elemental analysis and spectroscopic methods. All synthesized compounds are soluble in dimethylformamide and dimethylsulfoxide. All ligands and their complexes were also tested for their antibacterial (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*) [25] and antifungal properties. [25].

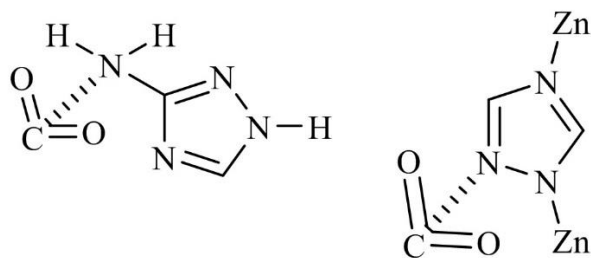


Figure 20. Experimentally-determined 1,2,4-triazole complexes [24]

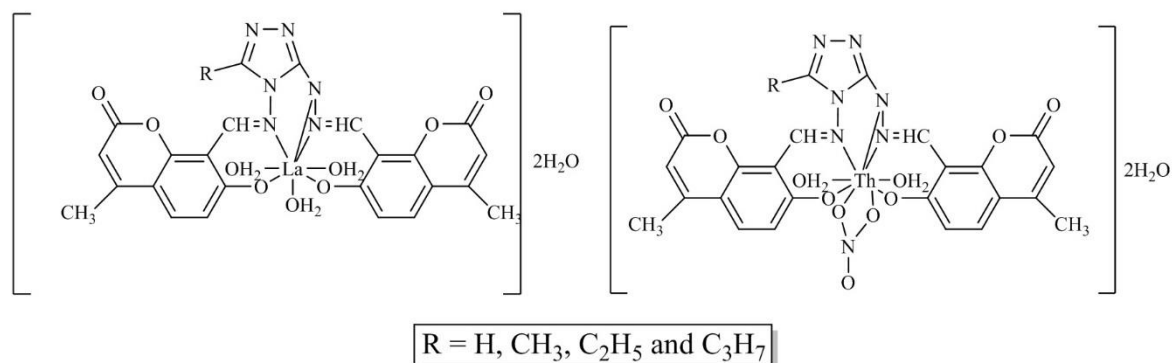


Figure 21. Complexes with 1,2,4-triazole ligands and central ions of La (Th) [25]

The authors [26] investigated a number of complex compounds based on 1,2,4-triazole. According to the researches, the obtained complexes have a fairly high resistance and are quite resistant to light.

After analyzing a number of scientific studies of scientists [1-32], we can conclude that studies of 1,2,4-triazole derivatives occupy an important place in the Ukrainian pharmaceutical industry [27-32]. The articles show that scientists have a fairly broad approach to the modification of 1,2,4-triazole heterocycle [27-30]. Aspects of studies of the biological action of 1,2,4-triazole derivatives are also covered. The scientists pay special attention to histological [33] and pharmacokinetic studies [34], studies of actoprotective action [35] and other types of screening tests [36-40]. Based on the heterocyclic system of 1,2,4-triazole, many drugs with antifungal, antibacterial, antioxidant and hepatoprotective effects have been developed and introduced into medical practice.

As a result of the review, a vector of further research has been formed. It represents the formation of complex structures from bioactive derivatives of 1,2,4-triazoles.

To create bioactive structures, it is appropriate to combine 1,2,4-triazoles with heterocyclic systems. As a rule, biological activity depends on the number of electron-donor atoms in the heterocyclic system. The processed data allows to conclude that it is appropriate to emphasize the creation of new Schiff bases, new thioacetic acids and their water-soluble salts.

According to the methods presented in the review, it is proposed to investigate the coordination complexes and to correlate between the new coordination compounds and salts of 1,2,4-triazole-3-thioacetic acids, with the same cations as in the complex compounds.

ACKNOWLEDGEMENT

The team of authors expresses their sincere gratitude to Zaporizhzhia State Medical University for the opportunity to perform the scientific studies within the walls of the university.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception: *Y.G.S.*; Design: *T.M.K.*; Supervision: *Y.G.S.*; Resources: *F.A.Z.*; Analysis and/or interpretation: *Y.G.S.*; Literature search: *Y.G.S., T.M.K., F.A.Z.*; Writing manuscript: *Y.G.S.*; Critical review: *Y.G.S.*

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Khan, S., Imam, S., Ahmad, A., Basha, S., Husain, A. (2018). Synthesis, molecular docking with COX 1& II enzyme, ADMET screening and in vivo anti-inflammatory activity of oxadiazole, thiadiazole and triazole analogs of felbinac. *Journal Of Saudi Chemical Society*, 22(4), 469-484. [\[CrossRef\]](#)
2. Barbuceanu, S., Draghici, C., Barbuceanu, F., Bancescu, G., Saramet, G. (2015). Design, synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of some heterocyclic condensed systems with bridgehead nitrogen from thiazolotriazole class. *Chemical And Pharmaceutical Bulletin*, 63(9), 694-700. [\[CrossRef\]](#)
3. Mioc, M., Avram, S., Bercean, V., Kurunczi, L., Ghiulai, R. M., Oprean, C., Soica, C. (2018). Design, synthesis and biological activity evaluation of S-substituted 1H-5-mercapto-1,2,4-triazole derivatives as antiproliferative agents in colorectal cancer. *Frontiers in chemistry*, 6, 1-19. [\[CrossRef\]](#)

4. Nastasă, C., Vodnar, D., Ionuț, I., Stana, A., Benedec, D., Tamaian, R., Onica, O., Tipericiuc, B. (2018). Antibacterial evaluation and virtual screening of new thiazolyl-triazole schiff bases as potential DNA-gyrase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 222. [\[CrossRef\]](#)
5. Karbalaeei, M., Seifi, M., Sheibani, H. (2014). Regioselective ring opening of 2,2-dicyanooxiranes by 1,3-dinucleophiles in the presence of Lewis acids such as bismuth(III) nitrate pentahydrate [Bi(NO₃)₃·5H₂O] and zirconium(IV) chloride (ZrCl₄). *Research on Chemical Intermediates*, 41(7), 4679-4686. [\[CrossRef\]](#)
6. Ur-Rehman, A., Nafeesa, K., Athar Abbasi, M., Zahra Siddiqu, S., Rasool, S., Adnan Ali Shah, S., Ashraf, M., Lodhi, M.A., Khan, F.A., Jahan, B. (2018). S-substituted derivatives of 1,2,4-triazol-3-thiol as new drug candidates for type II diabetes. *Turkish Journal of Chemistry*, 42(3), 652-67. [\[CrossRef\]](#)
7. Luo, J., Liu, Y., Liu, Y., Wang, J., Chai, T., & Yuan, J., Chang, S., Yu, Y., Jing, S., Ma, H. (2017). Synthesis and theoretical studies of a new insensitive explosive, 2'-methyl-3-nitro-2'H-[1,3'-bi(1,2,4-triazole)]-5,5'-diamine. *Central European Journal of Energetic Materials*, 14(2), 269-280. [\[CrossRef\]](#)
8. Ahmed, S., Zayed, M., El-Messery, S., Al-Agamy, M., Abdel-Rahman, H. (2016). Design, Synthesis, Antimicrobial Evaluation and Molecular Modeling Study of 1,2,4-Triazole-Based 4-Thiazolidinones. *Molecules*, 21(5), 568. [\[CrossRef\]](#)
9. Ali, G., El-Hiti, G., Tomi, I., Haddad, R., Al-Qaisi, A., Yousif, E. (2016). Photostability and performance of polystyrene films containing 1,2,4-triazole-3-thiol ring system schiff bases. *Molecules*, 21(12), 1699. [\[CrossRef\]](#)
10. Sameliuk, Y. (2016). PhD Thesis. Synthesis and study of biologically active 1,2,4-triazoles-3-thione derivatives, which contain methoxyphenyl substituents. Zaporizhzhia State Medical University. [\[CrossRef\]](#)
11. Lin, G., Duan, W., Yang, L., Huang, M., Lei, F. (2017). Synthesis and antifungal activity of novel myrtenal-based 4-methyl-1,2,4-triazole-thioethers. *Molecules*, 22(2), 193. [\[CrossRef\]](#)
12. Benhammadi, S., Salimairaten, S., Othman, A. (2016). Synthetic studies and antibacterial activity of nucleobases and their N- and S-glucosides from 2-amino benzoic acid and its benzamido derivatives. *Oriental Journal of Chemistry*, 32(5), 2567-2576. [\[CrossRef\]](#)
13. Popiołek, Ł., Paruch, K., Patrejko, P., Biernasiuk, A., Wujec, M. (2016). New 3-hydroxy-2-naphthoic hydrazide derivatives: thiosemicarbazides and 1,2,4-triazole-3-thiones, their synthesis and in vitro antimicrobial evaluation. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 13(10), 1945-1951. [\[CrossRef\]](#)
14. Boraei, A., El Ashry, E., Duerkop, A. (2016). Regioselectivity of the alkylation of S-substituted 1,2,4-triazoles with dihaloalkanes. *Chemistry Central Journal*, 10, 22. [\[CrossRef\]](#)
15. Khalid, W., Badshah, A., Khan, A., Nadeem, H., Ahmed, S. (2018). Synthesis, characterization, molecular docking evaluation, antiplatelet and anticoagulant actions of 1,2,4 triazole hydrazone and sulphonamide novel derivatives. *Chemistry Central Journal*, 12, 11. [\[CrossRef\]](#)

16. Sargsyan, A., Avakyan, A., Vartanyan, S., Stepanyan, G., Paronikyan, R. (2018). Synthesis of new 1,4-benzodioxanyl-1,2,4-triazole derivatives. *Russian Journal of General Chemistry*, 88(4), 839-842. [\[CrossRef\]](#)
17. Idrees, M., Kola, S., Siddiqui, N. (2018). Synthesis of novel series of quinolino[3,2-f][1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]-thiadiazepines derivatives incorporated with 3-[5-(benzofuran-2-yl)-1-phenyl-1h-pyrazol-3-yl] moiety as potent antimicrobial agent. *Asian Journal of Chemistry*, 30(9), 2129-2133. [\[CrossRef\]](#)
18. Kumar, A., Naaz, A., Prakasham, A., Gangwar, M., Butcher, R., Panda, D., Ghosh, P. (2017). Potent anticancer activity with high selectivity of a chiral palladium n-heterocyclic carbene complex. *ACS Omega*, 2(8), 4632-4646. [\[CrossRef\]](#)
19. Li, J., Liu, H., Guo, Z., Yang, M., Song, J., Ma, H. (2018). Two Cu(ii)-triadimenol complexes as potential fungicides: synergistic actions and DFT calculations. *RSC Advances*, 8(6), 2933-2940. [\[CrossRef\]](#)
20. Van Dijk, B., Hofmann, J., Hettterscheid, D. (2018). Pinpointing the active species of the Cu(DAT) catalyzed oxygen reduction reaction. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20(29), 19625-19634. [\[CrossRef\]](#)
21. Wang, X., Bai, X., Lin, H., Sun, J., Wang, X., Liu, G. (2018). A series of new polyoxometalate-based metal-organic complexes with different rigid pyridyl-bis(triazole) ligands: assembly, structures and electrochemical properties. *RSC Advances*, 8(40), 22676-22686. [\[CrossRef\]](#)
22. Popov, I., Davis, B., Mukundan, R., Batista, E., Yang, P. (2019). Catalyst-inspired charge carriers for high energy density redox flow batteries. *Frontiers In Physics*, 6, 141. [\[CrossRef\]](#)
23. Arkhipushkin, I., Shikhaliev, K., Potapov, A., Saprionova, L., Kazansky, L. (2017). Inhibition of brass (80/20) by 5-mercaptopentyl-3-amino-1,2,4-triazole in neutral solutions. *Metals*, 7(11), 488. [\[CrossRef\]](#)
24. Del Bene, J., Elguero, J., Alkorta, I. (2018). Complexes of CO₂ with the azoles: tetrel bonds, hydrogen bonds and other secondary interactions. *Molecules*, 23(4), 906. [\[CrossRef\]](#)
25. Bagihalli, G., Patil, S., Badami, P. (2009). Synthesis, spectral characterization, in vitro microbial and cytotoxic studies of lanthanum(III) and thorium(IV) complexes with 1,2,4-triazole Schiff bases. *Journal of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry*, 24(3), 730-741. [\[CrossRef\]](#)
26. Chen, D., Zheng, Y., Shi, D., Fang, S. (2020). An acid-base resistant polyoxometalate-based metal-organic framework constructed from {Cu₄Cl}⁷⁺ and {Cu₂(CO₂)₄} clusters for photocatalytic degradation of organic dye. *Journal of Solid State Chemistry*, 287, 121384. [\[CrossRef\]](#)
27. Hulina, Y., Kaplaushenko, A. (2017). Synthesis and physical-chemical properties of 6-(5-(1H-tetrazole-1-ylmethyl)-4-R-1,2,4-triazole-3-ylthio)pyridin-3-amines and 6-((5-(1H-tetrazole-1-yl)methyl-4-R-1,2,4-triazole-3-ylthio)pyridin-3-yl)-(alk,ar,heter)ylmethanimines. *Zaporozhye Medical Journal*, 19(1), 100-104. [\[CrossRef\]](#)
28. Frolova, Y. (2020). Design, synthesis, antimicrobial and antifungal activities of new 1,2,4-triazole derivatives containing 1H-tetrazole moiety. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 44(1), 70-88. [\[CrossRef\]](#)

29. 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. [\[CrossRef\]](#)
30. 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. [\[CrossRef\]](#)
31. Varynskyi, B., Kaplaushenko, A. (2019). The Force degradation study of the morpholinium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)-4h-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 30(1), 25-34. [\[CrossRef\]](#)
32. Danilchenko, D., Safonov, A. (2017). Diuretic activity of 2-((4-amino-5-R-4H-1,2,4-triazole-3-yl)thio)acetohydrazides. *Zaporozhye Medical Journal*, 19(4), 517-519. [\[CrossRef\]](#)
33. Vashchuk, Y., Shcherbyna, R., Parchenko, V., Bushueva, I., Gutyj, B., Fotina, H., Stronskyi, Y. (2020). Histological study of a corrective influence of a compound potassium 2-((4-amino-5-(morpholinomethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl) thio)acetate (pkr-173) on the state of chicken's liver under infection by pseudomonas aeruginosa. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 44(1), 1-17. [\[CrossRef\]](#)
34. Shcherbyna R. (2020). 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. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 44(2), 233-241. [\[CrossRef\]](#)
35. Safonov, A. A., & Nevmyvaka, A. V. (2020). Actoprotective activity research of 2-((5-(2-bromophenyl)-4-substituted-4H-1,2,4-triazole-3-yl)thio)acetates. . *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, 13(2), 260-264. [\[CrossRef\]](#)
36. Ihnatova, T., Kaplaushenko, A., Frolova, Y., Pryhlo, E. (2021). Synthesis and antioxidant properties of some new 5-phenethyl-3-thio-1, 2, 4-triazoles. *Pharmacia*, 68, 129-133. [\[CrossRef\]](#)
37. Gotsulya, A., Zazhzharskiy, V., Davidenko, P. (2020). Features of experimental modeling of tuberculosis in guinea pig with the participation of N'-(2-(5-((theophylline-7-yl)methyl)-4-R-1,2,4-triazole-ylthio)acetyl)isonicotinohydrazide. *Ukrainian Journal of Ecology*, 10(4), 191-194. [\[CrossRef\]](#)
38. Hotsulia, A.S., Fedotov, S.O. (2020). Synthesis and properties of 2-(4-phenyl-5-(((5-phenylamino-1,3,4-thiadiazole-2-yl)thio)methyl)-1,2,4-triazole-3-yl)thio)ethanoic acid and its salts. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, 3, 330-336. [\[CrossRef\]](#)
39. Zozulynets, D.M., Kaplaushenko, A.G., Korzhova, A.S. (2021). The synthesis of 4-amino-5-(quinolin-2-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol and its interaction with aldehydes. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*, 19(1(73)), 48-52. [\[CrossRef\]](#)
40. Varynskyi, B., Kaplaushenko, A. (2020). Metabolism study of morpholinium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)thio)acetate. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 33(2), 72-75. [\[CrossRef\]](#)



SYNTHESIS OF INDOLES DERIVATIVES USING METAL FREE CATALYST IN ORGANIC REACTIONS

ORGANİK REAKSİYONLARDA METAL İÇERMEYEN KATALİZÖR KULLANILARAK İNDOL TÜREVLERİNİN SENTEZİ

Hemlata DANGI¹ , Ratnesh DAS^{1,*} , Sushil KASHAW² 

¹Dr Harisingh Gour Central University Sagar, (M.P.), Department of Chemistry, 470003, India

²Dr Harisingh Gour Central University Sagar, (M.P.), Department of Pharmaceutical Sciences, 470003, India

ABSTRACT

Objective: Indole derivatives are one of the most flexible and common nitrogen-based skeletons and often used in the synthesis of numerous heterocyclic compounds, having biological or medicinal importance. Many indole derivatives have been isolated naturally from plants, fungi, and marine organisms and are highly important due to their pharmaceutical activities. They also play a significant character in polymer and dye industries as well as in the agriculture sector. There exists an immense potential for designing and methodology development for the synthesis of indole based heterocyclic scaffold structure with desire chemical and biomedical relevance.

Result and Discussion: In this present review, we outlined the recent applications of indoles in the one-pot multi-component reaction using metal free catalysts for the preparation of various heterocyclic scaffolds and their corresponding biological activities are also discussed.

Keywords: Indole derivatives, metal free catalyst, one pot multi-component reaction, synthesis

ÖZ

Amaç: İndol türevleri azot bazlı iskeletlerden biridir ve biyolojik veya tıbbi önemi olan birçok heterosiklik bileşiğin sentezinde sıklıkla kullanılır. Birçok indol türevi bitkilerden, mantarlardan ve deniz organizmalarından doğal olarak izole edilmiştir ve farmasötik aktiviteleri nedeniyle oldukça önemlidirler. Ayrıca polimer ve boya endüstrilerinde ve tarım sektöründe de önemli rol oynarlar. İstenen kimyasal ve biyomedikal özelliklere sahip indol bazlı heterosiklik iskelet yapısının sentezi için tasarım ve metodoloji geliştirmeye ihtiyaç vardır.

Sonuç ve Tartışma: Bu derlemede, çeşitli heterosiklik yapı iskeletlerinin hazırlanması için metal içermeyen katalizörlerin kullanıldığı, tek kap çok bileşenli reaksiyonlarla indollerin son uygulamaları özetlenmiştir ve bunlara karşılık gelen biyolojik aktiviteler tartışılmıştır.

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Ratnesh Das
e-mail / e-posta: ratneshdas1@gmail.com, **Phone / Tel.:** +917697834544

Anahtar Kelimeler: *Indol türevleri, metallsiz katalizör, sentez, tek potalı çok bileşenli reaksiyon*

INTRODUCTION

Heterocyclic compounds have a high significance in the synthesis of medicinal and/as well organic synthesis and have a widespread application in the field of polymer, agriculture, medicine and in many industries. Multi-component reactions (MCRs) [1] are the key tool to prepare various heterocyclic derivatives with different properties by deploying several functional groups and creating numerous carbon-carbon, and carbon-heteroatom linkages. Over several years MCRs get significant attention due to easy process, efficient to produce a good yield, and cost-effectiveness. Indoles (Fig. 1), imidazoles, thazines, pyrroles, quinolones, and pyridine derivatives are pharmacologically interesting heterocycles which show biological activity and antimicrobial activity [2].

Indole derivatives have attracted attention over a few decades, because of many activities such as antimicrobials [3], pharmacological, anti-fungals [4], and anti-tumor [5], anti-inflammatories, antivirals [6], antibiotics drugs [7], and anticancer [8] (Fig. 2). Recently, Arvelexin (a 3-substituted indole derivative) is used as an anti-influenza agent. Hien T. Le and co-workers demonstrate indole-3-carbinol having activity against human protease cancer cells. Some indole derivatives work as an anti-oxidant agent through trapping free radicals and reduce the risk of cancer and cardiovascular diseases.

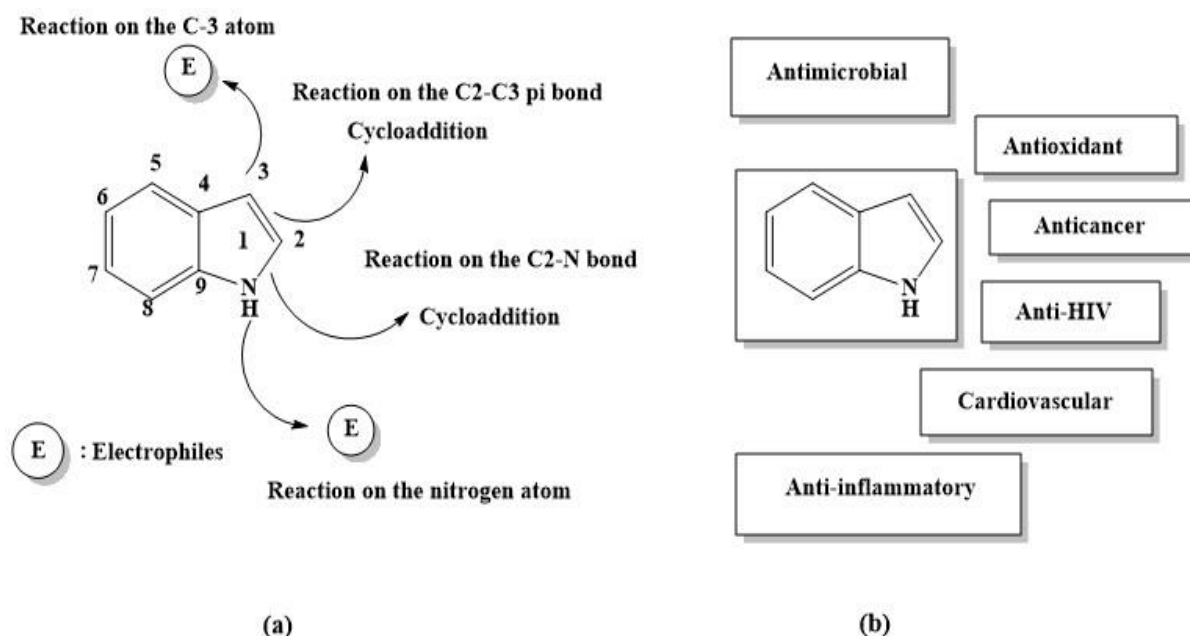


Figure 1. a) Reactive sites of Indole and b) Bio-activity of indole derivatives

In this study we addressed recent developments in organic synthesis methodology for multicomponent reactions for the preparation of substituted indole derivatives with a more environmentally friendly metal free catalysis, as well as their corresponding applications in recent

decades. The rate of substitution is highest at C-3 position, followed by N-position to produce N-substituted indole and it is least at C-2 position.

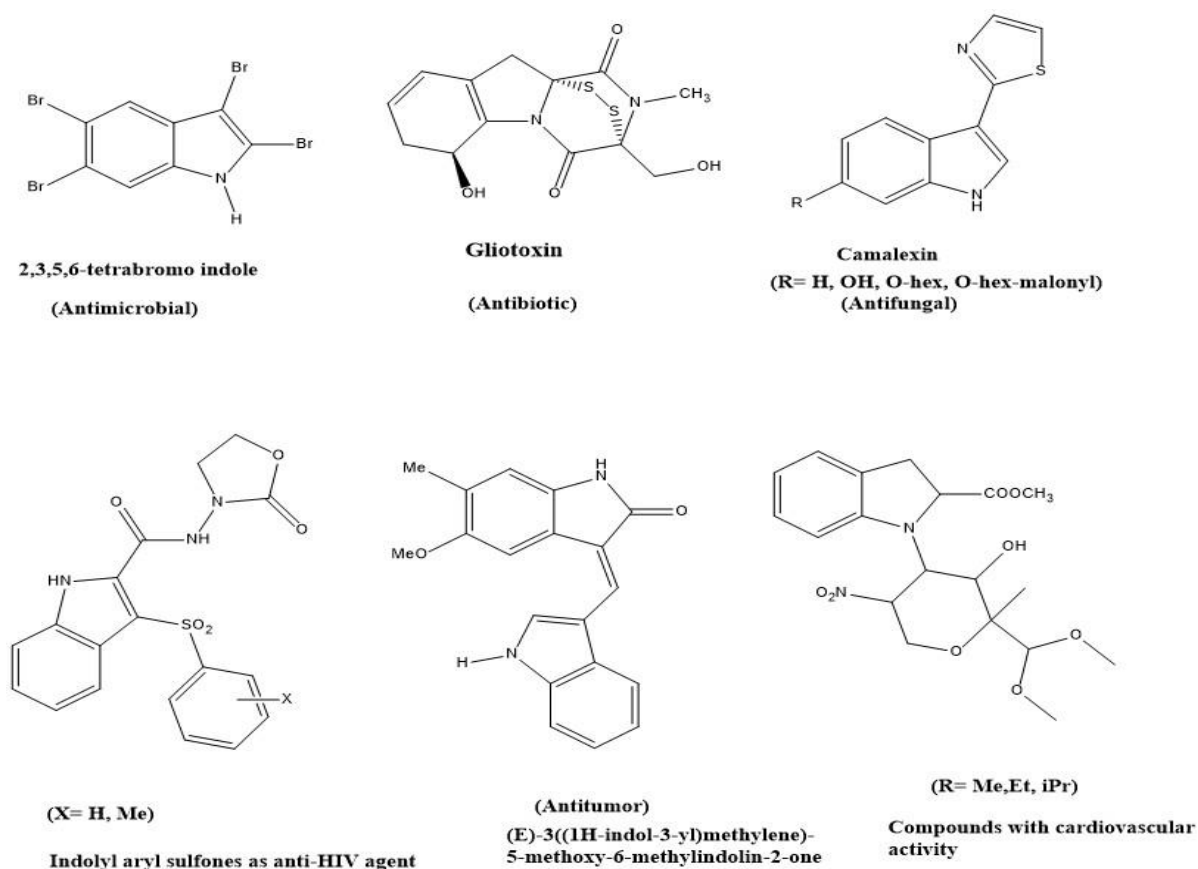


Figure 2. Example of some biologically active indole derivatives

This review focuses mainly on the reactivity at C-3 sites of indole as well as the corresponding properties of products in detail. Few miscellaneous multi-component reactions with indole have also been reviewed.

Methods for Preparation of Indole Derivatives

A variety of methods have been established to successfully production of a library of indole derivatives using metal-catalyzed reactions, multi-component synthesis, microwave synthesis, ultrasonication method, etc. Among them most feasible metal-free multi-component synthesis is our main interest.

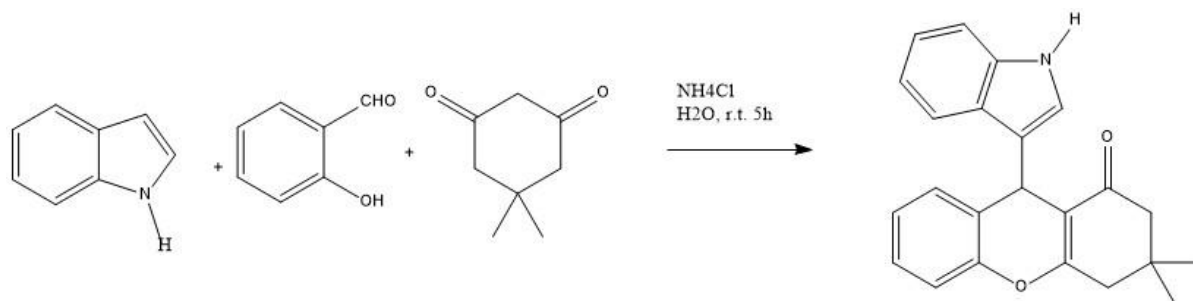
Brief Review on Multicomponent Reactions of Indoles

Multi-component reaction (MCR) is a process where three (e.g. Passerini reaction) or more than three (e.g. four component Ugi reaction) components are used in a suitable solvent for a single reaction to obtain an ultimate substrate proposing superior opportunities or potentials for molecular diversity

with greater efficiency of reactions and reduction of time, effort and cost. Indole containing one benzene ring and one five-membered pyrrole type moiety can easily participate in multi-component reactions, by reactions through its various reactive sites. Indole undergoes substitution reactions at the N1, C2, and C3 sites, as well as cycloaddition reactions via the C2–C3 and C2–N sigma bonds.

Multicomponent Reactions at the C-3 Position

Bhattacharjee and co-workers [10] have introduced ammonium chloride for the synthesis of 9-(1H-indol-3-yl)-3,3-dimethyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-xanthen-1-one as a catalyst for the one-pot three-component synthesis of indole with aldehyde(o-hydroxy) and dimedone(1,3-dione) compounds (Scheme1). Ganguly et al. [11] re-investigated the same procedure, in which L-proline was used as a catalyst in an aqueous solvent for 2 hours.

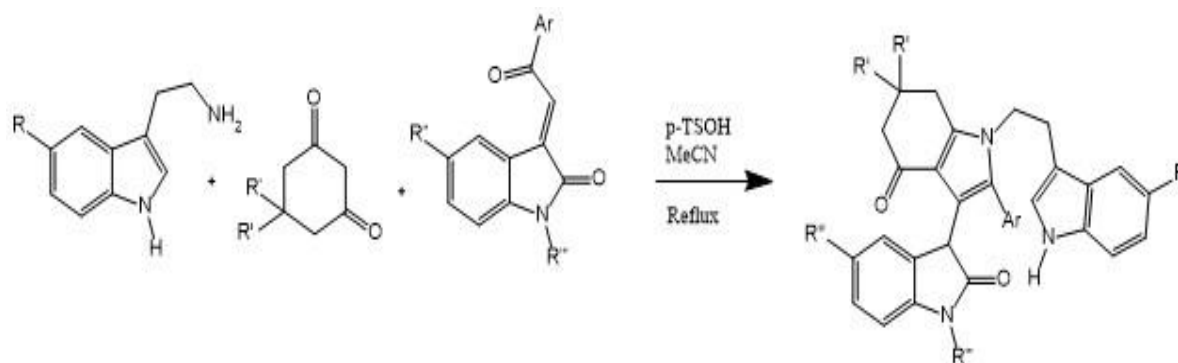


Scheme 1. Represents the indole (three-component) reaction, which consists of indole, salisaldehyde, and dimedone [11]

Jiang and Yan [12] achieved the synthesis of 3-substituted indole using a one-pot three-component reaction. They synthesized 3-1-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]-4,5,6,7-tetrahydro-1H-indol-3-ylindolin-2-ones by condensation of 2-(1H-indol-3-yl) ethanamine with 3-phenacylidene oxindoles and dimedone in acetonitrile under refluxing conditions with p-toluene sulfonic acid catalyst (Scheme 2).

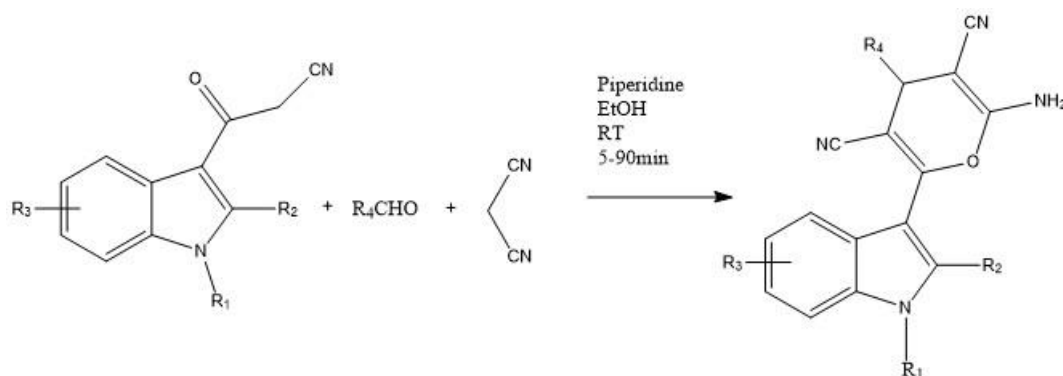
Klenc et al. [13] and Fatma et al. [14] have demonstrated an efficient synthetic route for indol-3-yl substituted with pyran derivatives using ultrasonic irradiation and a reaction with piperidine activity as a catalyst. A sharp enhancement of yield was observed for the same reaction in presence of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and thiamine hydrochloride (vitamin B1) as catalyst (Scheme 3).

The earlier method (1-pot 3-component) condensation was introduced for the synthesis of indole-based tetra-arylimidazoles by Naureen's group [16]. In this approach 2-arylidole-3-carbaldehydes are reacted with aniline and benzyl in the presence ammonium acetate and acetic acid (Scheme 5). The synthesized compounds has shown anti-urease activity.



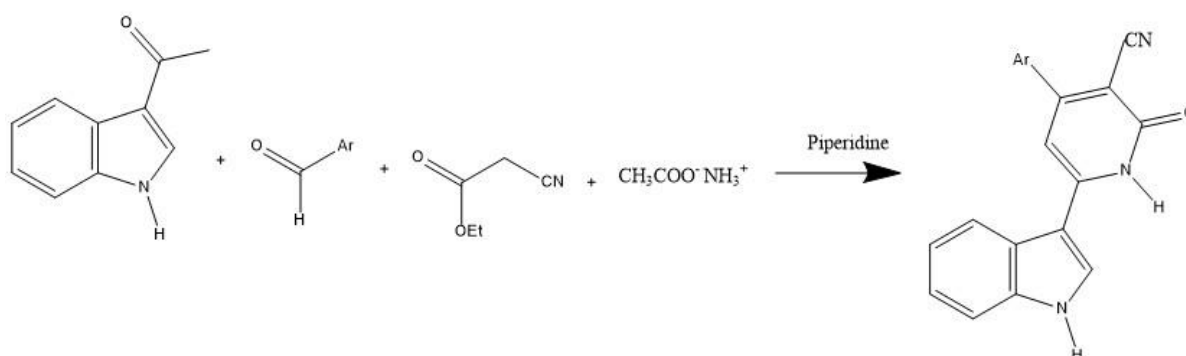
$R^1 = \text{H, OMe}$; $R^2 = \text{H, Cl, F, Me}$; $R^3 = \text{H, Bn}$; $\text{Ar} = \text{Ph, 4-ClC}_6\text{H}_4, 4\text{-OMeC}_6\text{H}_4$; p- TsOH: p- Toluenesulfonic acid

Scheme 2. Synthesis of three components of 3-{1-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]-4,5,6,7-tetrahydro-1H-indol-3-yl}indolin-2-ones [12]

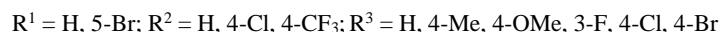
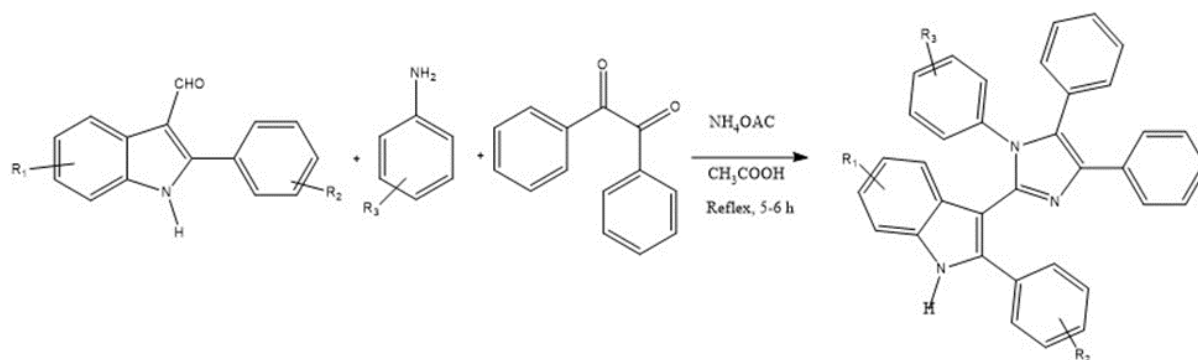


$R^1 = \text{H, Me}$; $R^2 = \text{H, Ph}$; $R^3 = 5\text{-Br, 7-Me}$; $R^4 = \text{Ph, 4-MeC}_6\text{H}_4, 4\text{-MeOC}_6\text{H}_4, 2,4\text{-Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3, 2\text{-BrC}_6\text{H}_4, 3\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4, 4\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4, 2\text{-Naphthyl}$

Scheme 3. Synthesis of indole derivatives(3-substituted compounds) [14]

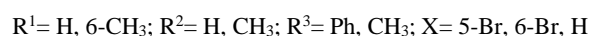
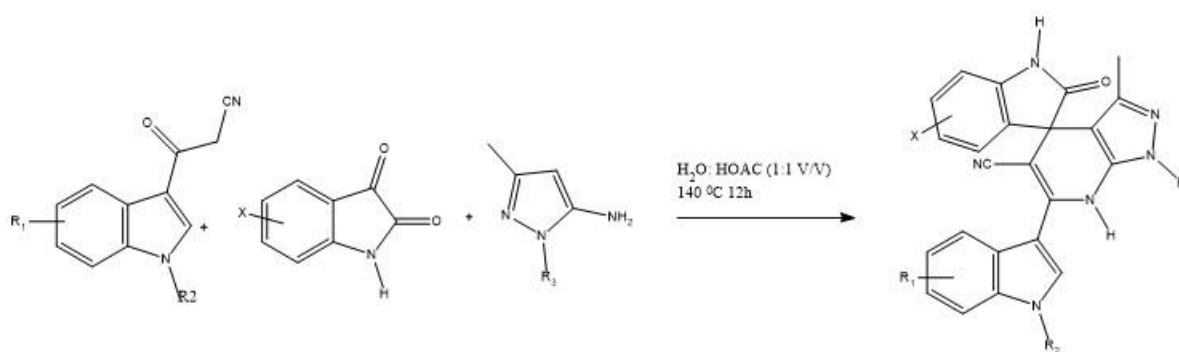


Scheme 4. Multi-component condensation reactions (one-pot) of aromatic aldehydes, ethyl cyanoacetate, 3-acetylindole and ammonium acetate using piperidine as catalyst [15]



Scheme 5. Reaction of 2-arylidole-3-carbaldehydes with substituted anilines and benzyl in the presence of ammonium acetate and acetic acid [16]

Chen *et al.* [17] prepared a variety of C-3 substituted compounds, including polysubstituted 6'-(1H-indol-3-yl)-1',7'-dihydrospiro[indoline-3,4'-pyrazolo[3,4-b]pyridine]-2-one derivatives in acetic acid/water using a simple atom-saving method involving a one-pot three-component condensation reaction (Scheme 6).

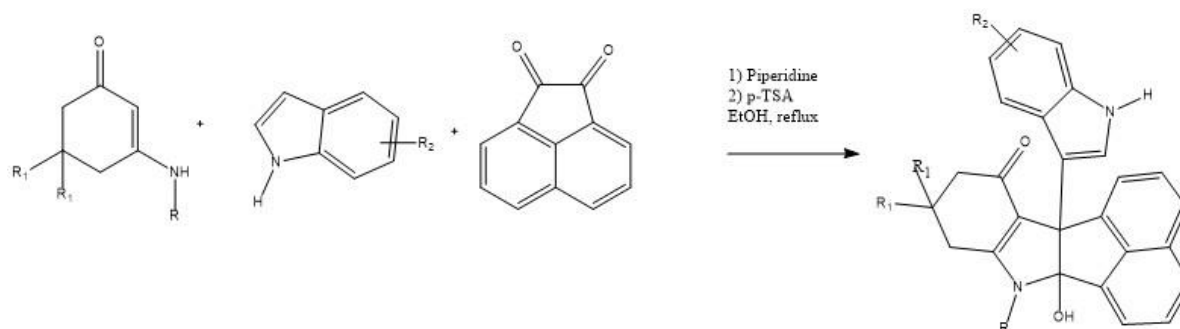


Scheme 6. A three-component one-pot reaction of involving 3-cyanoacetyl indoles, isatins, and 1H-pyrazol-5-amines in H₂O/ HOAc [17]

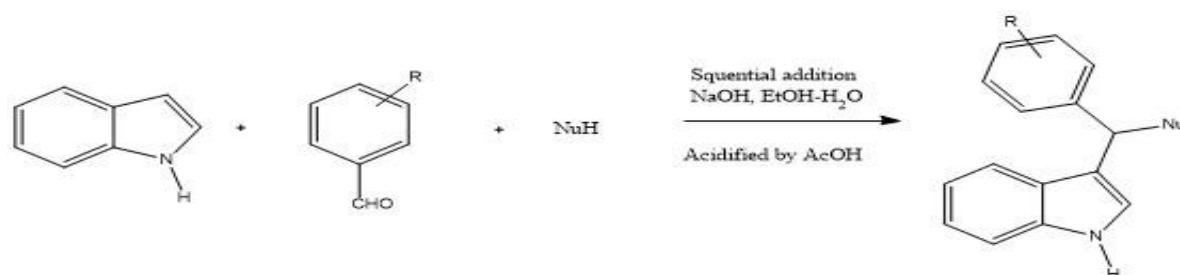
Indole, acenaphthylene-1,2-dione, and enaminone were combined in a one-pot three-component reaction in the presence of piperidine and p-TSA as catalyst to produce indole derivatives (Scheme 7) [18].

Borpatra *et al.* [19] have synthesized a one-pot 3-component indole derivatives in the presence of base catalysts with the reaction of indole and benzaldehyde at room temperature and sodium hydroxide in EtOH-H₂O as solvent after the reaction formation of 3-indolylalcohols (Scheme 8). To obtain the desired product in its purest form, the material was purified using column chromatography.

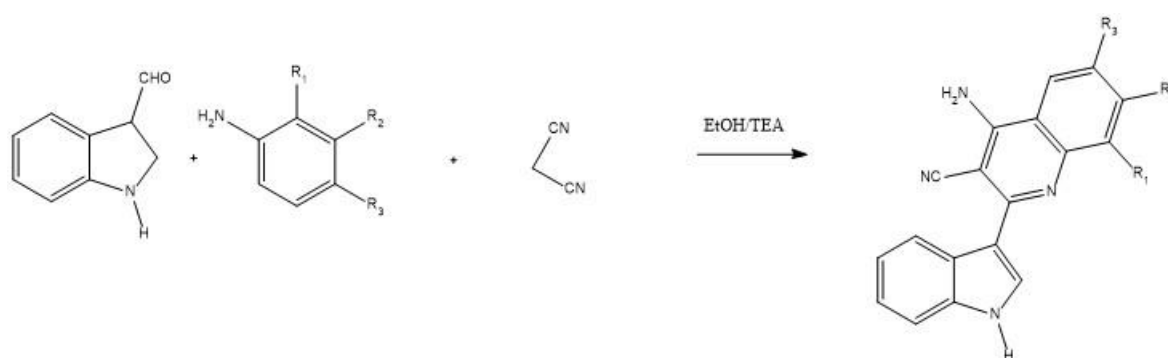
Fawzy *et al.* [20] synthesized some indole derivatives by the reaction of 1H-indole-3-carbaldehyde, aniline derivatives and malononitrile ethanol using triethylamine as a catalyst. The mixture was continuously stirred. Using thin-layer chromatography, the reaction's progress was tracked, and a precipitate was developed. The pure products were obtained by filtering the precipitate, washing with ethanol, and drying (Scheme 9).



Scheme 7. Synthesis of bis-indoles [18]



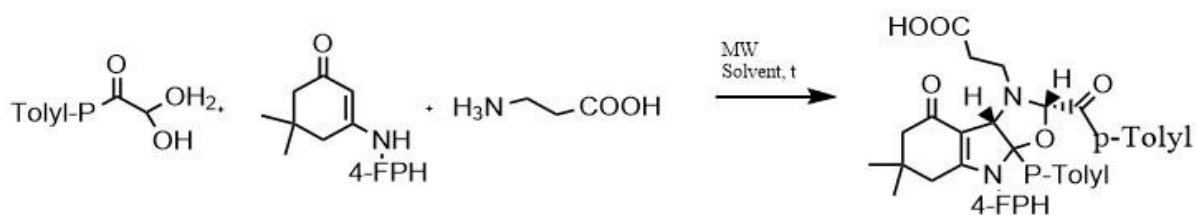
Scheme 8. Represents a three-component reaction synthesis of 3- substituted indole derivatives [19]



Scheme 9. Represents a three component reaction of indole derivatives [20]

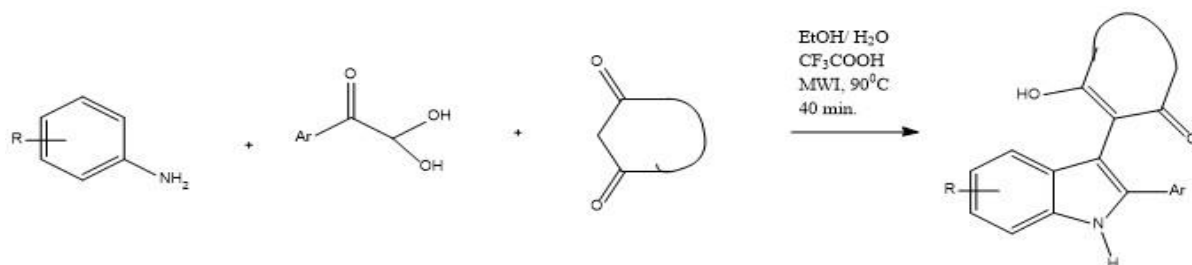
Wang *et al.* [21] were performed bicyclization reaction method to produce a catalyst free product called oxazolo[5,4-b]indoles by using microwave-assisted three-component. The reaction conditions

include: arylglyoxal (2.0 mmol, 2.0 equiv), cyclic enaminone (1.0 mmol, 1.0 equiv), alanine (1.0 mmol, 1.0 equiv), solvent (2.0 mL), air, and microwave heating (Scheme 10).



Scheme 10. A microwave-assisted three-component bicyclization [21]

Lin *et al.* [22] used aniline (1 mmol), arylglyoxal monohydrate (1 mmol), cyclic 1,3-dicarbonyl compound (1 mmol), and CF_3COOH (0.2 mmol) to make indoles under microwave irradiation. They combined all the compounds in a 10 ml initiator reactor vial, followed by ethanol (2 ml), and water (2 ml). After that, the reaction was close-up, pre-stirred for 10 seconds, and microwave-irradiated for 40 minutes at 90 °C (Scheme 11). Thin-layer chromatography was used to track the reaction (3:1 ratio mixture of petroleum ether and ethyl acetate). The reaction mixture was cool to room temperature until the solvent was vaporised at a low pressure. The crude product was purified using column chromatography with petroleum ether and ethyl acetate as eluents.



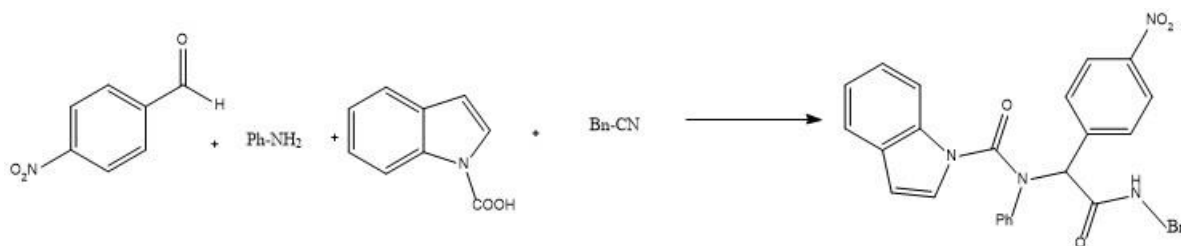
Scheme 11. Indole synthesis is based on a three-component reaction under microwave irradiation [22]

Zeng *et al.* [23] established a multi-component reaction for the synthesis of indole carboxamide amino amides using 4-nitrobenzaldehyde, aniline, indole-N-carboxylic acid, and benzyl isocyanide (Scheme 12).

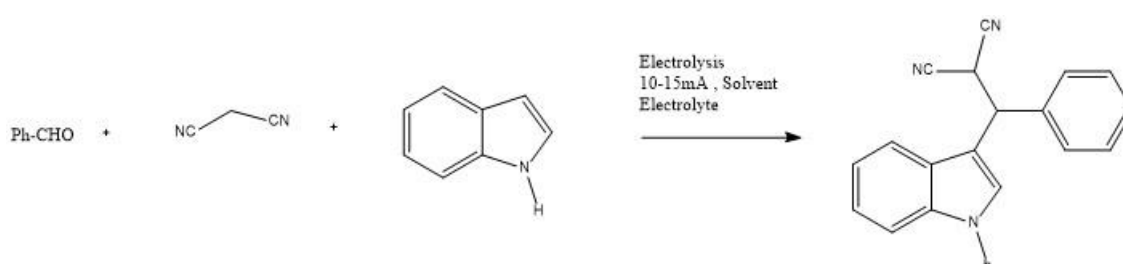
Indole or N-methyl indole or substituted indole, aldehyde or substituted aldehyde, and malononitrile were reacted to form the novel 3-substituted indole, according to Singh *et al.* [24] catalyst free reaction presence of an electrolyte and ethanol as solvent. These environmentally friendly, electrochemical reaction procedure was simple, efficient and reaction condition were mild. This synthesis has therapeutic applications (Scheme 13).

The development of new methodologies for the synthesis of one-pot four- component reaction of 3-(1H-indol-3-yl)-3-oxopropanenitrile, aldehydes, 3-acetyl-2H-chromenones, and ammonium acetate in

acetic acid (Scheme 14). These reaction highly functionalized and advantages less reaction time under metal-free reaction condition [25].

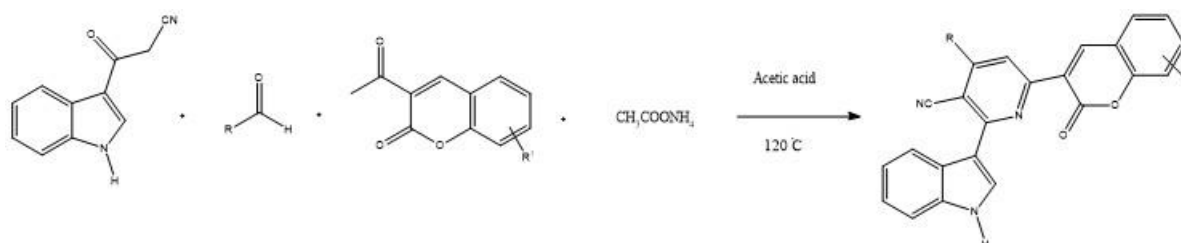


Scheme 12. Represent a four component chemical reaction [23]



Solvent = MeOH, EtOH, n-PrOH, CH₃CN; Electrolyte = LiClO₄, NaBr, KBr, Bu₄NClO₄

Scheme 13. Synthesis of 3-substituted indole in a three-component reaction [24]

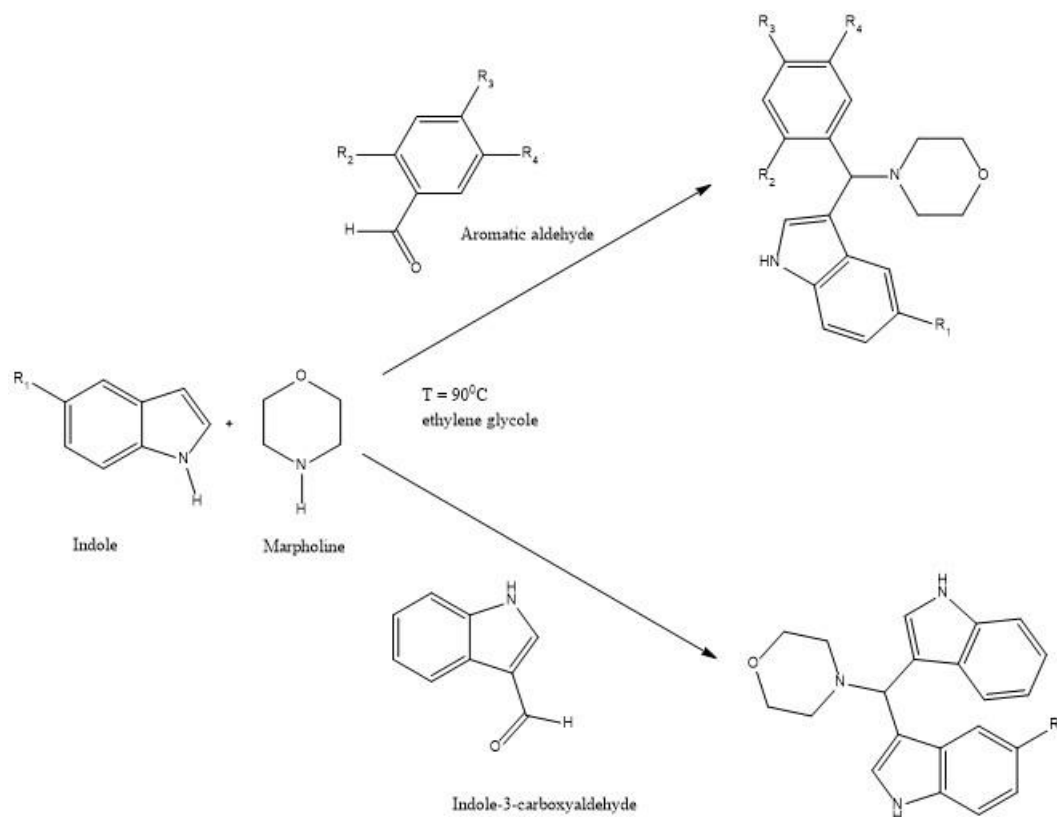


R = Aromatic, Heteroaromatic and Aliphatic; R¹ = H, Br, OH, N(Me)₂, N(Et)₂, OMe, OEt

Scheme 14. Represent a four component reaction [25]

Mazzotta *et al.* synthesized 3-amino-alkylated indoles by heating the mixture of indole and aldehydes with morpholine in ethylene glycol at 90°C for 1 hour, then cooling it at room temperature and filtering it under vacuum. To extract ethylene glycol, the rough solid was partitioned between chloroform and water. The eluent was N-hexane/ethyl acetate (3:1), which was then distilled using flash column chromatography (Scheme 15). In this region, indole derivatives have shown to be effective anti-inflammatory agents [26].

The efficient and advantageous synthesis of indole in the presence of ethanol as a solvent react one-pot multi-component reaction of 2,5-disubstituted indole-3-carbaldehyde, isoniazid, and naphthalen-2-ol, quinolin-8-ol, or 4-hydroxy-2 H-chromen-2-one by Rathod *et al.* In vitro anti-tubercular activity was observed with these compounds [27] (Scheme 16).



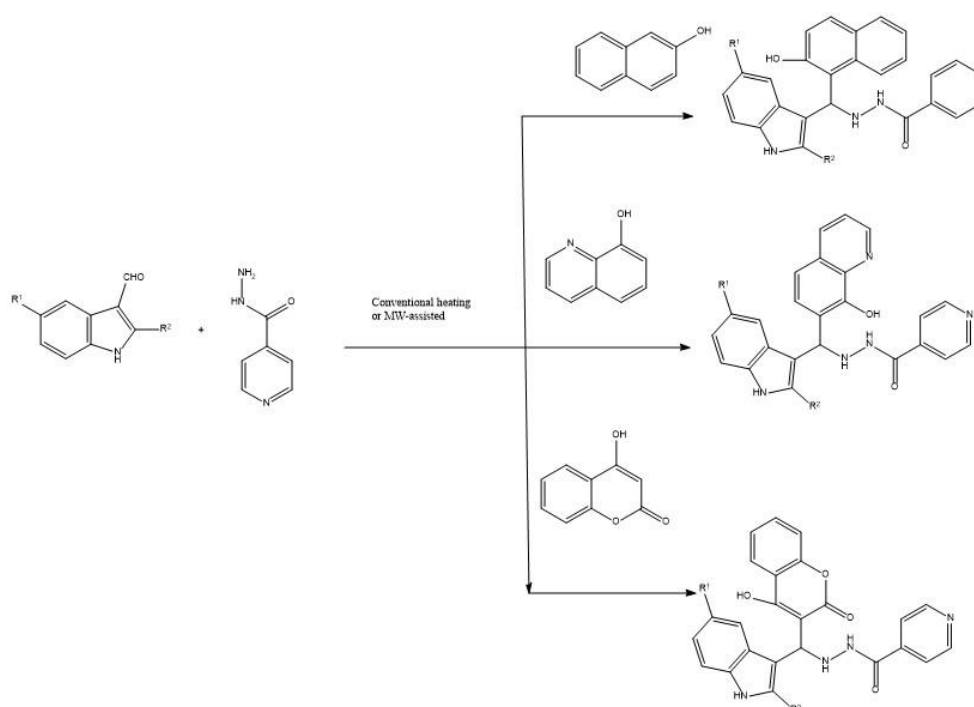
Scheme 15. Multi-component synthesis of GLYC compounds [26]

Dhuguru and Skouta [29] have developed an indole-chalcone derivative that binds to tubin and inhibits cancer cell development. In the presence of piperidine as a catalyst, the condensation reaction between the acetophenone derivative and the indole-3-carboxaldehyde yields FC77 (Scheme 18).

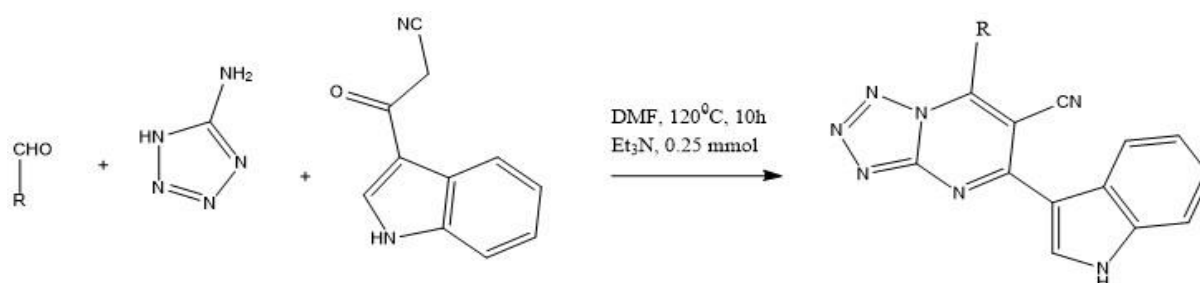
A domino reaction between arylglyoxals, acetylacetone, indole, and aliphatic amines in water without any catalyst was performed to produce a four-component one-pot synthesis of pyrrole functionalized indole derivatives by Mousavizadeh *et al.* [30] (Scheme 19).

Kumari *et al.* described the efficient synthesis of the carbohydrate related pyrazoline and isoxazole bridged C-glycoside (O-linkages) of indole hybrids identified a unsaturated-C-glycosidic ketone molecule that can be synthesised using C-glycoside as a substrate. The resulting-unsaturated-C-glycosidic ketone molecule can then be nucleophilically added to hydrazine hydrate/hydroxyl amines at room temperature or at elevated temperatures, and transformed into the desired pyrazoline or isoxazole bridged C-glycoside of indole by dehydration [31] (Scheme 20).

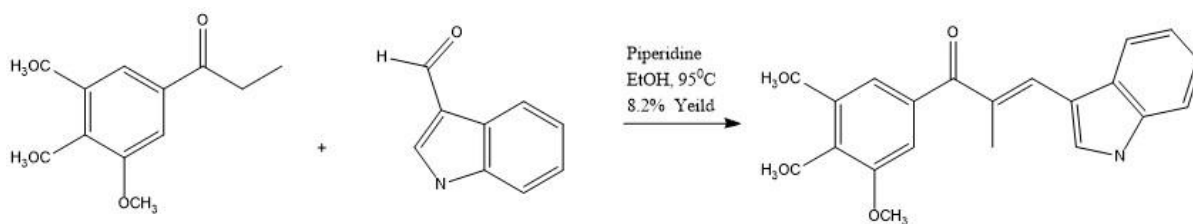
Yang and Li *et al.* [32] synthesized indole derivatives in the presence of potassium hydroxide, benzylidene malononitrile (Scheme 21). The benzylidene malononitrile reacts with indole at inert N₂ gas, product by Michael addition was obtained in 65% yield, and the oxidative cross-coupling product were detected in traces. Moreover, Michael addition product was readily converted into cross-coupling product in high yield under the standard conditions. This meant that the Michael addition product may be a potential intermediate in the reaction of malononitrile with indole to produce cross-coupling product, and that air is needed for its formation. In the presence of potassium hydroxide, these intermediates are dehydrated, yielding cross-coupling product as the final product [32].



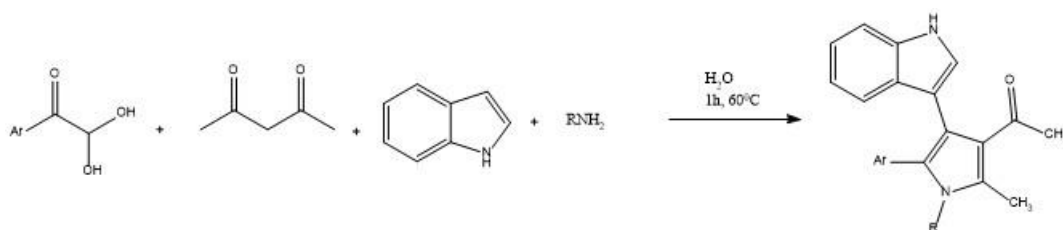
Scheme 16. The indole and isoniazid derivatives were synthesised with the aid of microwaves [27]



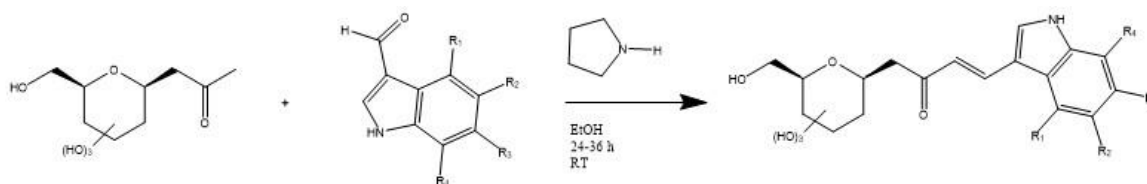
Scheme 17. Synthesis of novel 7-substituted-5-(1H-Indol-3-yl)tetrazolo[1,5-a]pyrimidine-6-carbonitrile in a three-component reaction [28]



Scheme 18. An indole-chalcone derivative is synthesised in the presence of piperidine as a catalyst [29]

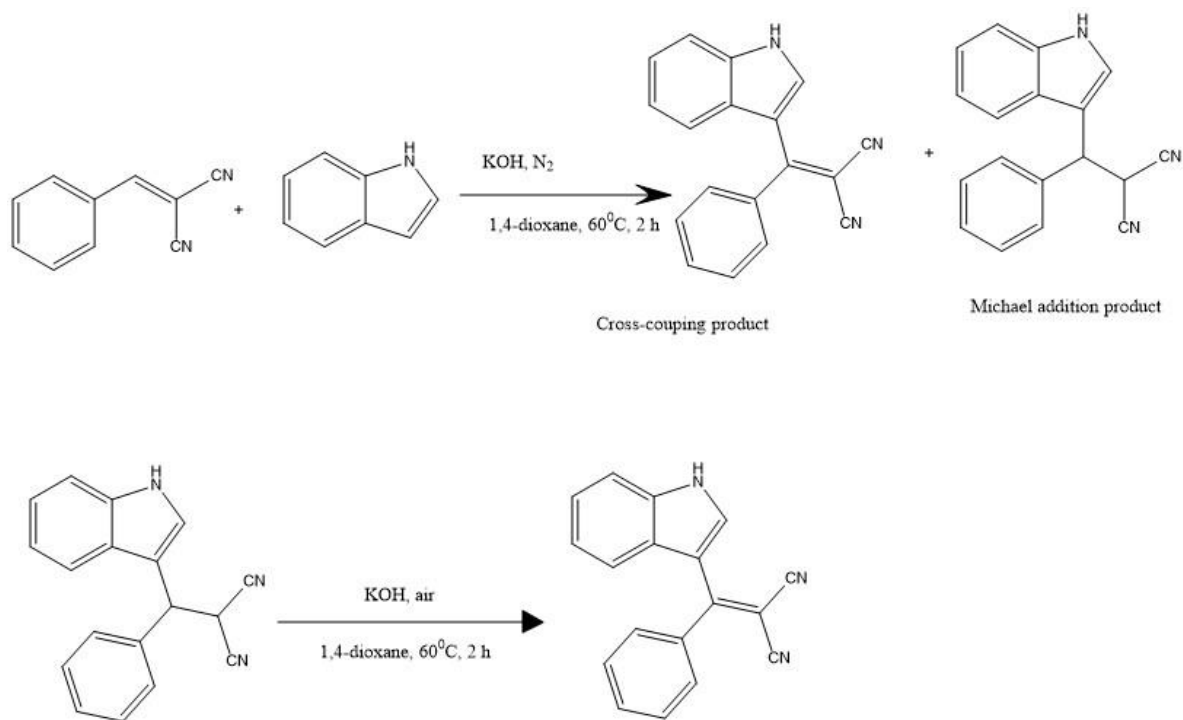


Scheme 19. The reaction of arylglyoxals, acetylacetone, indole, and aliphatic amines yields indolylpyrrole derivatives [30]



Scheme 20. Synthesis of various indole C-glycosides [31]

In conclusion, this review encapsulates recent signs of progress in the synthesis of pharmaceutically significant indole heterocyclic skeletons. Here we count simple, cheap, atomically efficient, less time and effort consumable processes with metal-free organic acid/base catalyzed synthesis of highly functionalized indoles. From the last few decades, a heterocyclic compound with indole linkage has gained significant importance in medicinal, natural product chemistry, and pharmaceutical industries. In all of the above mentioned one pot multi-component reactions indicates a large potential for the synthesis of biologically beneficial molecules, through C-H activation and condensation reactions. Our review provides an overview of the plausible synthetic procedure of indole derivative that can help for deciding the future strategy for the preparation of a library of indole derivatives with medicinal importance.



Scheme 21. Synthesis of indole- functionalized arylidenemalononitriles [32]

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are thankful to the Head of the Department of chemistry Dr. Harisingh Gour Central University, Sagar (MP), India, for providing laboratory facilities and CSIR Delhi India for giving NET-JRF fellowship grant.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception: R.D.; Design: H.D., R.D.; Supervision: R.D.; Resources: R.D., S.K.; Materials: H.D., R.D.; Data collection and/or processing: H.D.; Analysis and/or interpretation: H.D., R.D.; Literature search: H.D., R.D., S.K.; Writing manuscript: H.D., R.D.; Critical review: H.D., R.D.; Other:-

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Yellappa, S. (2020). An anti-Michael route for the synthesis of indole-spiro (indene-pyrrolidine) by 1,3-cycloaddition of azomethineylide with indole-derivatised olefins. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 57, 1083–1089. [\[CrossRef\]](#)

2. Tha, S., Shakya, S., Malla, R., Aryal, P. (2020) Prospects of Indole derivatives as methyl transfer inhibitors: Antimicrobial resistance managers. *BMC Pharmacology Toxicology*, 21, 1–11. [\[CrossRef\]](#)
3. Sayed, M., Younis, O., Hassanien, R., Ahmed, M., Mohammed, A.A.K., Kamal, A.M., Tsutsumi, O. (2019). Design and synthesis of novel indole derivatives with aggregation-induced emission and antimicrobial activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 383, 111969. [\[CrossRef\]](#)
4. Parle, A., Kumar, N. (2020). Synthesis, characterization and evaluation of 3- acetylindole derivatives as potential antifungal agents. 9(6), 468–474. Retrieved from <https://www.thepharmajournal.com/archives/?year=2020&vol=9&issue=6&ArticleId=4808>
5. Mo, Z.-Y., Wang, X.-Y., Zhang, Y.-Z., Yang, L., Tang, H.-T., Pan, Y.-M. (2020). Electrochemically enabled functionalization of indoles or anilines for the synthesis of hexafluoroisopropoxy indole and aniline derivatives. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 18, 3832–3837. [\[CrossRef\]](#)
6. Wei, C., Zhao, L., Sun, Z., Hu, D., Song, B. (2020). Discovery of novel indole derivatives containing dithioacetal as potential antiviral agents for plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 166, 104568. [\[CrossRef\]](#)
7. Turner, D.N., Edwards, L., Kornienko, A., Frolova, L.V., Rogelj, S. (2020). Synergistic action of substituted indole derivatives and clinically used antibiotics against drug-resistant bacteria. *Future Microbiology*, 15(8), 579–590. [\[CrossRef\]](#)
8. Syahri, J., Hidayah, N., Hilma, R., Nurohmah, B.A. (2020). Design of new 2,4-substituted furo [3,2-b]indole derivatives as anticancer compounds using quantitative structure-activity relationship (QSAR) and molecular docking. *Molekul*, 15(1), 9 – 17. [\[CrossRef\]](#)
9. Zeng, L., Lin, Y., Cui, S. (2020). Indole-N-carboxylic acids and indole-N-carboxamides in organic synthesis. *Chemistry—An Asian Journal*, 15, 973–985. [\[CrossRef\]](#)
10. Bhattacharjee, S., Das, D.K., Khan, A.T. (2014). Ammonium chloride-catalyzed three-component reaction for the synthesis of fused 4H-chromene derivatives in aqueous medium. *Synthesis*, 46, 73–80. [\[CrossRef\]](#)
11. Ganguly, N.C., Roy, S., Mondal, P., Saha, R. (2012). An efficient one-pot organocatalytic synthesis of 9-(1H-indol-3-yl)-xanthen-4-(9H)-ones under mild aqueous micellar conditions. *Tetrahedron Letters*, 53, 7067–7071. [\[CrossRef\]](#)
12. Jiang, Y.H., Yan, C.G. (2016). Three-component reaction for the convenient synthesis of functionalized 3-{1-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]-4,5,6,7-tetrahydro-1H-indol-3-yl}indolin-2-ones. *Synthesis*, 48, 3057–3064. [\[CrossRef\]](#)
13. Klenc, J., Saczewski, J., Paluchowska, A., Raux, E. (2009). Synthesis of 4-substituted 2-(4-methylpiperazino)pyrimidines and quinazoline analogs as serotonin 5-HT 2A receptor ligands. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 46, 1259–1265. [\[CrossRef\]](#)
14. Fatma, S., Singh, D., Ankit, P., Mishra, P., Singh, M., Singh, J. (2014). An eco-compatible multicomponent strategy for the synthesis of new 2-amino-6-(1H-indol-3-yl)-4-arylpyridine-3,5-dicarbonitriles in aqueous micellar medium promoted by thiamine-hydrochloride.

- Tetrahedron Letters*, 55, 2201–2207. [\[CrossRef\]](#)
15. El-Sayed, N.S., Shirazi, A.N., El-Meligy, M.G., El-Ziaty, A.K., Rowley, D., Sun, J., Nagib, Z.A., Parang, K. (2014). Synthesis of 4-aryl-6-indolylpyridine-3-carbonitriles and evaluation of their antiproliferative activity. *Tetrahedron Letters*, 55, 1154–1158. [\[CrossRef\]](#)
 16. Naureen, S., Ijaz, F., Munawar, A.M., Asif, N., Chaudhry, F., Ashraf, M., Khan, M.A. (2017). Synthesis of tetrasubstituted imidazoles containing indole and their antiurease and antioxidant activities. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 62, 3583–3587. [\[CrossRef\]](#)
 17. Chen, T., Xu, X.P., Ji, S.J. (2010). Novel, one-pot, three-component route to indol-3-yl substituted spirooxindole derivatives. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 12, 659–663. [\[CrossRef\]](#)
 18. Chen, X.B., Xiong, S.L., Xie, Z.X., Wang, Y.C., Liu, W. (2019). Three-component one-pot synthesis of highly functionalized bis-indole derivatives. *ACS Omega*, 4, 11832–11837. [\[CrossRef\]](#)
 19. Borpatra, P.J., Deka, B., Rajbongshi, B.K., Deb, M.L., Baruah, P.K. (2018). One-pot sequential multi-component reaction: Synthesis of 3-substituted indoles. *Synthetic Communications*, 48, 2074–2082. [\[CrossRef\]](#)
 20. Fawzy, N.M., Roaiah, H.M., Awad, E.M., Wietrzyk, J., Milczarek, M., Soliman, A.M.M. (2018). Synthesis of new indole derivatives using one-pot multicomponent reaction with antiproliferative towards normal and cancer cell lines. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 17(2), 1687–4315 [\[CrossRef\]](#)
 21. Wang, L. Shi, L.-X., Lu, L., Li, Z.-X., Xu, T.W., Hao, J., Li, G., Tu, S.-J., Jiang, B. (2017). Synthesis of diastereoenriched oxazolo[5,4-b]indoles via catalyst-free multicomponent bicyclizations. *Journal of Organic Chemistry*, 82, 3605–3611. [\[CrossRef\]](#)
 22. Lin, W., Zheng, Y.X., Xun, Z., Huang, Z.B., Shi, D.Q. (2017). Microwave-assisted regioselective synthesis of 3-functionalized indole derivatives via three-component domino reaction. *ACS Combinatorial Science*, 19, 708–713. [\[CrossRef\]](#)
 23. Zeng, L., Sajiki, H., Cui, S. (2019). Multicomponent ugi reaction of indole- n-carboxylic acids: expeditious access to indole carboxamide amino amides. *Organic Letters*, 21, 5269–5272. [\[CrossRef\]](#)
 24. Singh, V.K., Dubey, R., Upadhyay, A., Sharma, L.K., Singh, R.K.P. (2017). Electrochemical approach for synthesis of 3-substituted indole derivatives. *Tetrahedron Letters*, 58, 4227–4231. [\[CrossRef\]](#)
 25. Krishnammagari, S.K., Balwe, S.G., Kim, J.S., Lim, K.T., Jeong, Y.T. (2019). A one-pot four-component domino protocol for the synthesis of indole and coumarin containing pyridine-3-carbonitrile derivatives. *Monatshefte für Chemie*, 150, 691–702. [\[CrossRef\]](#)
 26. Mazzotta, S., Frattaruolo, L., Brindisi, M., Ulivieri, C., Francesca, V., Brizzi, A., Carullo, G., Cappello, A.R., Aiello, F. (2019). 3-Amino-alkylated indoles: Unexplored green products acting as anti-inflammatory agents. *Future Medicinal Chemistry*, 12, 5–17. [\[CrossRef\]](#)
 27. Rathod, A.S., Reddy, P.V., Biradar, J.S. (2020). Microwave-assisted synthesis of some indole and isoniazid derivatives as antitubercular agents and molecular docking study. *Russian Journal*

- of Organic Chemistry*, 56, 662–670. [\[CrossRef\]](#)
28. Radwan, M.A.A., Alminderej, F.M., Awad, H.M. (2020). One-pot multicomponent synthesis and cytotoxic evaluation of novel 7-substituted-5-(1H-indol-3-yl)tetrazolo[1,5-a] pyrimidine-6-carbonitrile. *Molecules*, 25, 255. [\[CrossRef\]](#)
 29. Dhuguru, J., Skouta, R. (2020). Role of indole scaffolds as pharmacophores in the development of anti-lung cancer agents. *Molecules*, 25, 1615. [\[CrossRef\]](#)
 30. Mousavizadeh, F., Talebizadeh, M., Anary-Abbasinejad, M. (2018). Synthesis of new indolylpyrrole derivatives via a four-component domino reaction between arylglyoxals, acetylacetone, indole and aliphatic amines in aqueous media. *Tetrahedron Letters*, 59, 2970–2974. [\[CrossRef\]](#)
 31. Kumari, P., Mishra, V.S., Narayana, C., Khanna, A., Chakrabarty, A., Sagar, R. (2020). Design and efficient synthesis of pyrazoline and isoxazole bridged indole C-glycoside hybrids as potential anticancer agents. *Scientific Reports*, 10, 6660. [\[CrossRef\]](#)
 32. Yang, A., Li, Z. (2020). Transition-metal-free aerobic oxidative cross-coupling of indoles with arylidenemalononitriles. *Synlett*, 31, 194–198. [\[CrossRef\]](#)

TIBBİ KENEVİR VE SAĞLIK: FARMAKOLOJİK BİR DERLEME

MEDICAL CANNABIS AND HEALTH: A PHARMACOLOGICAL REVIEW

Özge BALPINAR * , Selim AYTAÇ 

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Kenevir Araştırmaları Enstitüsü, 55270, Samsun, Türkiye

ÖZ

Amaç: Kenevir antik çağlardan bugüne dek tedavi amaçlı kullanılmakta olan bir bitkidir. Her ne kadar kullanımı içerdiği psikoaktif bileşenler dolayısıyla sınırlandırılmış olsa da, kenevirin tıbbi yönüne dair araştırmalar literatürde oldukça yoğundur. *Cannabis sativa L.*, içerdiği fitokannabinoidler ile endokannabinoid sistemde gen düzeyinde pek çok değişikliğe sebep olabilmektedir. Endokannabinoid sistemin pek çok patolojik durumda potansiyel bir terapötik hedef olabileceğine dair kanıtların derlenmesi hedefiyle bu çalışma ortaya koyulmuştur.

Sonuç ve Tartışma: Endokannabinoid sistem içerisinde yer alan reseptörler, endokannabinoidler veya enzimlerin ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişiklikler, Parkinson, Alzheimer, Huntington gibi hastalıkların patolojileriyle ilişkili olabilmektedir. Aynı zamanda endokannabinoid sistemde meydana gelen değişikliklerin kanser hücrelerinin metastazi, yayılımı, proliferasyonunu etkileyebilmektedir. Buna ek olarak cannabinoidlerin, dolayısıyla kenevirin, nöropatik ağrının tedavisinde rol oynadığı gösterilmiştir. Günümüzde kemoterapiye bağlı bulantı ve kusma tedavisinde kullanılan dronabilon ve nabilon kapsülleri gibi bazı kenevir-temelli tedavi preparatları pek çok ülkede onaylanmış, kullanıma sunulmuştur. Δ^9 tetrahidrocannabinol/cannabidiol oromukozal sprey gibi preparatlar da pek çok bölgede kanser hastalarında analjezik olarak ya da multiple skleroz hastalarının kas spastisitelerinin giderilmesinde kullanımı onaylanan preparatlardandır. Ancak endokannabinoid sistemin terapötik etkinlik üzerindeki önemi dikkate alındığında, daha pek çok tıbbi durum için kenevirin standardize edilmiş preparatlarına ve bu doğrultuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kannabinoid, kanser, kenevir, nörodejeneratif hastalıklar.

ABSTRACT

Objective: *Cannabis sativa L.* is a plant that has been used for therapeutic purposes since ancient times. However, its use has been limited due to its content. Cannabis causes many changes at the gene level in the endocannabinoid system with the phytocannabinoids it contains. The aim of this study was to provide evidence that the endocannabinoid system could be a potential therapeutic target in many pathological conditions.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Özge Balpınar
e-posta / e-mail: ozge.balpinar@omu.edu.tr, Tel. / Phone: 03623121919/6464

Result and Discussion: *The change in the expression levels of receptors, endocannabinoids or enzymes in the endocannabinoid system may be associated with the pathologies of diseases such as Parkinson, Alzheimer, and Huntington. Besides, changes in the endocannabinoid system can affect the migration, proliferation of cancer cells. Also, cannabinoids, have been shown to play a role in the treatment of neuropathic pain. Today, some cannabis-based treatment preparations such as dronabillon and nabilon capsules used in the treatment of chemotherapy-induced nausea and vomiting have been approved and available in many countries. Preparations such as Δ^9 tetrahydrocannabinol/cannabidiol oromucosal spray are also among the preparations approved for use as analgesic in cancer patients or for the relief of muscle spasticity in multiple sclerosis patients. However, standardized preparations of cannabis and further research are needed for many other medical conditions.*

Keywords: *Cancer, cannabinoid, cannabis, neurodegenerative diseases*

GİRİŞ

Kenevir (*Cannabis sativa* L.), 104'ü tanımlanmış kannabinoid olmak üzere 500'den fazla bileşik içeren psikoaktif etkilere sahip bir bitkidir. Kannabinoid bileşiklerinin ismi de kenevirin latince isminden köken almaktadır. Bu bitki psikoaktif etkileri sebebiyle çok eski zamanlardan bu yana tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır [1, 2].

Geleneksel Çin tıbbında astım, sıtma ve gut hastalığı tedavisi için kullanılan kenevirin, Hindistan'da migren, konvülsiyonlar ve nevralsi için kullanıldığı belirlenmiştir [3, 4]. Ondokuzuncu yüzyılda Avrupa ve Amerika'da kenevirin etanolden elde edilmiş ekstraktlarının oldukça popüler bir konuma eriştiği bilinmektedir. Bu ekstraktlar hayatı tehdit eden yenidoğanlarda konvülsiyonlar, tetanos, kolera ve kuduz gibi hastalıkların tedavilerinde kullanılmıştır. Ancak yirminci yüzyılın ilk yarısından itibaren kenevirin bu şekilde terapötik kullanımları, belirli bir standartta kenevir preparatlarının hazırlanamaması sebebiyle ortadan kaybolmuştur [5].

Kanada, Amerika Birleşik Devletleri ve İngiltere'deki eczanelerin raflarında yıllarca yer almakta olan kenevir, psikoaktif etkileri sebebiyle eleştirilere maruz kalmış, suç sayılmış ve 1970'li yıllarda yasadışı bir uyuşturucu olarak listelenmiştir. Bunun sebebi içeriğinde yer alan tetrahidrokannabinol gibi bazı fitokannabinoidlerin psikoaktif niteliklerinin suistimal edilmesi, kötüye kullanılması, bağımlılığa yol açabiliyor olmasıdır. 2014 yılında tarım yasasının yürürlüğe girmesiyle birlikte "endüstriyel kenevir" tanımı yapılmış, bu doğrultuda en fazla % 0,3 oranında tetrahidrokannabinol içeriğine sahip kenevir bitkilerinin araştırma amaçlı yetiştirilmesine izin verilmiştir. Ancak son 15-20 yıl içerisinde çeşitli rahatsızlıklar ve hastalıklar için kenevirin terapötik etkileri değerlendirilmek istenmiş, bu süreç de esrar içeriği ile kendisinden söz ettiren kenevirin pek çok yerde suç olmaktan çıkarılması, yasal bir forma eriştirilmesi ve bitkiye yönelik ilginin artırılması ile sonuçlanmıştır [6].

Kenevir Bitkisinin Botanik Özellikleri

Kenevir, botanik tanımlaması *Cannabis sativa* L. olan, ülkemizde bölgeden bölgeye değişen kendir, çetene, kınnap, kendirik tanımlamalarına sahip bitkidir [7]. Urticales takımının Cannabinaceae

familyası içerisinde *Cannabis* cinsi kapsamında yer almaktadır. Dioik bir bitki olan kenevirde, erkek ve dişi çiçekler aynı zamanda çiçek açmamaktadır. Tarımı yapılan kenevir bitkisinin kromozom sayısı $2n=20$ olarak belirlenmiştir [8].

Kazık köklü, dik gövdeli bir bitki olan kenevirin yüksekliği 1-6 m arasında değişiklik göstermektedir. Karşılıklı veya alternan olarak dallanan bitkinin kökleri 30-60 cm derinliğe ulaşırken, gevşek topraklarda bu ölçüm 2.5 metreye kadar çıkabilmektedir [9]. Tohumları 3-6 mm uzunluk, 2-4 mm genişliğe sahiptir. Türden türe değişmekle birlikte tohum renkleri genellikle gri, siyah, yeşilli koyu tonlardadır, tohum kabuğu incedir [10].

Kenevir içeriğinde kannabinoidlere ek olarak, 20'den fazla flavonoid tanımlanmıştır. Bitki içeriğinde yer alan flavonoidlerin anti-enflamatuvar, anti-alerjik ve sitoprotektif etkilere sahip olduğu belirlenmiştir. Flavonoidlere ek olarak kenevirde yer alan bir diğer fitokimyasal grubu da terpenlerdir. Terpenler kenevirin karakteristik kokusunun kaynağı olarak bilinmektedir. Hem monoterpenler hem de seskuiterpenler kenevirin köklerinde ve üst yapılarında tespit edilmiştir [11].

Kannabinoidler ve Endokannabinoid Sistem

Kenevir içeriğindeki en güçlü ve ana bileşen olarak bilinen madde $\Delta 9$ -tetrahidrokanabinoldür (THC). *Cannabis sativa* L. içerisinde THC'ye ek olarak $\Delta 8$ -tetrahidrokanabinol ($\Delta 8$ -THC), kannabinol (CBN) gibi fitokannabinoidler de bulunmaktadır. Bu maddelerin kenevir içeriğinde THC'ye kıyasla daha düşük oranda bulunduğu ve endokannabinoid sistem reseptörlerine daha düşük afinite ile bağlandıkları bilinmektedir [12,13]. Bunlara ek olarak son dönem bilimsel çalışmalarda sıkça görülen, popüler bir fitokannabinoid olmasıyla pek çok Cannabis preparatında da yer alarak adından sıkça söz ettiren bir diğer kannabinoid kannabidioldür (CBD). Kannabidiol THC'nin %10'u kadar aktivite sergiler ve psikoaktif bir bileşen değildir [8]. Ayrıca CBD, anksiyolitik ve antipsikotik özellikler sergilemektedir [14,15]. CBD'nin THC etkisi ile ortaya çıkan psikotropik özellikleri hafifletebilme potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir [16].

1990'lı yıllarda, yukarıda sözü edilen bileşiklerle ilişkili spesifik reseptörlerin varlığı tespit edilmiştir. Böylece kannabinoidlerin membran reseptörleri aracılığı ile etkilerini ortaya koydukları belirlenmiştir. Reseptörlerin keşfedilmesi, reseptörlerin aktifleşmesini sağlayan endojen nitelikli kannabinoidlerin yani endokannabinod ligandların araştırılmasına öncülük etmiştir. Bugün kannabinoid terimi ile hem bitkisel kaynaklı fitokannabinoidler hem endokannabinodiler hem de her iki grubun sentetik analogları ifade etmektedir. Bugüne kadar CB1 ve CB2 olmak üzere iki adet kannabinoid reseptörü üzerinde yoğunlaşmıştır [17,18]. CB1 reseptörünün büyük çoğunlukla merkezi sinir sisteminde (MSS) yer aldığı, buna ek olarak periferik sinir hücrelerinin terminallerinde de bulunduğu belirlenmiştir. CB1 nöronal olmayan dokularda da yayılıma sahiptir; rahim, prostat, testis, mide, vasküler endotelial sistem ve iskelet sistemi gibi dokularda da CB1 reseptörünün yaygın bir biçimde dağılım sergilediği görülmektedir. CB2 reseptörü ise CB1'e kıyasla daha sınırlı bir dağılıma sahiptir.

CB2 reseptörleri temel olarak immün sistemde yer almakta, hem immün sistemle ilişkili dokularda hem de immün sisteme ait hücrelerde bulunmaktadır [19,20]. Ancak CB2 reseptörleri inflamasyon gibi bazı durumlar ortaya çıktığında MSS'de yer alan glial hücrelerde de görülmektedir [21,22].

Kannabinodilerin tamamı etkilerini yalnızca CB1 ve CB2 reseptörleri üzerinden sergilememektedir. Bu süreçte hem endokannabinoidler hem de bitkisel kaynaklı kannabinoidlerin tamamı GPR55 ve GPR19 gibi G-protein kenetli reseptörler üzerinden etkilerini gösterebildiği gibi, TARPA1, TRPV1 ve TRPV2 gibi katyon kanalları üzerinden de etkilerini sergileyebilmektedir. GPR55 reseptörünün CB1 ve CB2 reseptörleri gibi endokannabinoid sistemin bir parçası olduğu düşünülmektedir [23].

Endokannabinoid sistem içerisinde, kannabinoid reseptörleri, endokannabinoidler ile bu maddelerin biyosentezi ve yıkımlarından sorumlu enzimler yer almaktadır. Endokannabinoid sistem, son döneme ait pek çok çalışmada patolojik durumların muhtemel bir terapötik hedefi olarak değerlendirilmiştir. Bu sistemin enerji dengesinin sağlanması, iştah uyarımı, kan basıncı, analjezi, bulantı ve kusmanın kontrol altına alınması, hafıza, öğrenme, bağışıklık sisteminin tepkilerinin düzenlenmesi gibi pek çok fizyolojik süreçte katılım gösterdiği bilinmektedir [24-27].

Bunlara ek olarak endokannabinoid sistemin bazı patolojik durumlarda koruyucu rol üstlendiği de bilinmektedir. endokannabinoid maddelerin seviyelerinde meydana gelen değişiklikler Parkinson, Huntington ya da multiple skleroz (MS) gibi nörolojik hastalıklara sebep olduğu gibi iştahsızlık veya irritabl bağırsak sendromu gibi durumlara da sebep olabilmektedir. Endokannabinoid sistem içerisindeki değişiklikler kontrolsüz proliferasyon, migrasyon ile karakterize kanser hastalıklarıyla da ilişkilendirilmektedir [28-32].

Kenevir ve Nörolojik Hastalıklar

Multiple Skleroz (MS)

Multiple skleroz hastalarında MS hastalığı ile birlikte endokannabinoid sistem içerisinde bazı sistem üyelerinin ekspresyon seviyelerinde değişimler olduğu tespit edilmiştir. Ölüm sonrası MS donörlerinin beyin dokularında CB1 ve CB2 reseptör ekspresyonlarında artış gözlemlendiği kaydedilmiştir [33]. Farklı alt tiplerde MS hastalığına sahip hastalardan alınan plazma örneklerinde, tüm numunelerde birkaç endokannabinoid seviyesinde artış olduğu kaydedilmiştir. Yalnızca ilerleyici MS (Primer progresif MS) hastalarında CB1 ve CB2 reseptörlerine ait ekspresyon seviyelerinde artış tespit edilmiştir. İkincil MS hastalarında ise endokannabinoidlerin bir kısmının yıkımından sorumlu bir enzimin ekspresyon seviyesinin azaldığı görülmüş, buna bağlı olarak bu hastaların plazmalarında ilgili endokannabinoid seviyesinin arttığı belirlenmiştir [34].

Kenevirin ve kannabinoidlerin MS hastalığındaki etkisini ve önemini belirlemek, hastalığın tedavisinde, semptomların kontrol altına alınmasındaki yerini ortaya koyabilmek adına çeşitli klinik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. 2,5 ve 5 mg dozlarında oral yolla kullanılan *Cannabis sativa* L.

ekstraktları ile $\Delta 9$ -THC'nin MS hastalığında ortaya çıkan kas spastisitesini iyileştirmede yetersiz kaldığı tespit edilmiştir [35]. Bu konuda gözle görülür bir iyileşme kaydedebilmek adına 7,5 mg dozunda $\Delta 9$ -THC kullanımının gerekli olduğu belirlenmiştir [36].

Kenevir ekstraktının tedavide kullanıldığı MS hastalarında kas sertliğinde plasebo grubuna kıyasla iki kata yakın bir gelişim görüldüğü kaydedilmiştir [37]. Kas spastisitesinde test edilen THC/CBD oromukozal sprey olan SativexTM'in kenevir ekstraktları veya THC'nin oral uygulamalarına kıyasla etki seviyesinin daha düşük olduğu belirlenmiştir [38, 39].

Multiple Skleroz ile ilişkili kaslarda ortaya çıkan sertlik, spastisite gibi semptomlarda kontrol gruplarına kıyasla kannabinoid ile tedavi gören hastalarda göreceli bir iyileşmenin olduğu kaydedilmiştir. Yapılan çalışmalarda sonuç farklılıkları, çalışmaların tasarımlarının, kullanılan tedavi dozlarının farklılığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bunlara ek olarak çalışmalarda MS tedavisi için kannabinoid kullanan hastalarda baş dönmesi, uyku hali, baş ağrısı, ağız kuruluğu gibi advers etkilerin ortaya çıktığı görülmüştür [40].

Epilepsi

Epilepside ortaya çıkan eksitotoksisite (glutamatın sinaptik aralıkta anormal ve aşırı artışı) durumuyla ilişkili olarak endokannabinoid sistemin bir role sahip olup olmadığı araştırmalara konu olmuştur. Bu amaçla gerçekleştirilen bir çalışmada fare modellerinde CB1 reseptörlerinin kainik asit kaynaklı eksitotoksisiteye karşı korumada rol sahibi olduğunu ifade etmiştir. Bu doğrultuda CB1 reseptörüne ait geni ihtiva etmeyen farelerin, CB1 reseptörüne sahip farelere kıyasla çok daha şiddetli nöbetler geçirdiği kaydedilmiştir. Buna ek olarak CB1 reseptörüne sahip farelerde endokannabinoid olan arşidonil etanolamin (Anandamid; AEA) seviyelerinin hipokampus bölgesinde arttığı gözlenmiş, bu durumun da endokannabinoid sistemin eksitotoksisiteye karşı koruyuculuğu ile ilişkili olduğu düşünülmüştür [41].

Prelinik çalışmalarda endokannabinoid sistemin epileptik nöbetlerle, eksitotoksisiteye karşı koruma sağlamasıyla ilişkili olarak elde edilen verilerin akabinde epilepsi hastalarıyla da bazı klinik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Girişimsel olmayan birkaç çalışmada antiepileptik ilaçlarla birlikte kenevirin hava yolu ile tüketiminin nöbetlerin kontrolünde etkili bir yaklaşım olabileceği bildirilmiştir [42-44]. Buna benzer başka bir çalışmada ise kenevirin benzer kullanımının epilepsi hastalarının nöbetlerini etkilemediği ifade edilmiştir [45].

Kenevir ekstraktlarıyla yapılan bir çalışmada çocuk epilepsi hastaları üzerinde CBD ile zenginleştirilmiş kenevir ekstraktları test edilmiştir. Elde edilen verilere göre gerçekleştirilen tedavi ile hastaların %84'ünde nöbet sıklığının azaldığı kaydedilmiştir. Buna ek olarak uygulanan tedavinin davranış, uyku ve uyanıklıkla ilgili de iyileşme sağladığı belirlenmiştir [46, 47].

EpidiolexTM CBD oral solüsyonunu kullanan febril nöbetli epilepsi hastası 7 kişiden 6'sında nöbet sıklığının ve süresinin iyileştiği bildirilmiştir [48]. Yüksek THC, düşük CBD içeriğine sahip

kenevirli kullanan epilepsi hastası çocuklarda, kullanmayanlara kıyasla daha şiddetli nöbetlerin gerçekleştiği belirlenmiştir. Çalışmalardaki farklı sonuçların, kullanılan kenevir ekstraktların içeriğindeki etken maddelerin oranlarının değişikliğiyle ilişkili olduğu ifade edilmektedir. Bu durumda nöbetlerin tedavisinde CBD en umut verici kannabinoid olarak görülmektedir [49].

Parkinson

Endokannabinoid sistemin özellikle bazal ganglionlarda yüksek ekspresyon seviyesine sahip olduğu görülmüştür. Bu durumun hareket kontrolü ile ilişkisinin incelenmesi neticesinde, endokannabinoid sistem aktivasyonunun motor inhibisyonla ilişkili olduğu belirlenmiştir [50, 51]. Parkinson hastası bireylerden ölüm sonrası alınan beyin örneklerinde bazal ganglianın bazı bölümlerinde CB1 reseptörlerinin ekspresyonlarında azalma gözlemlendiği ifade edilmiştir. Nükleus akübens, ön ile arka ventral putamen ve substantia nigra bölümlerinde ise CB1 reseptörü ekspresyon seviyesi değişiklik arz etmemiştir [52].

Parkinson hastalığının farklı aşamalarında olan hastalardan alınan beyin omurilik sıvısı örnekleri incelendiğinde, AEA endokannabinoidinin seviyesinin hastalık evresinden bağımsız bir biçimde normale kıyasla iki kat artış gösterdiği kaydedilmiştir [53].

Parkinson modeli oluşturulmuş sıçanlarda yapılan bir çalışmada CB1 reseptörünün bloke edilmesi antiparkinson etki meydana getirmiştir. Rimonabant olarak bilinen (SR141716A) CB1 reseptör antagonistinin striatum, globus pallidus ve subtalamik çekirdeğe uygulanmasıyla parkinsonlu farelerde motor asimetrisinin azaldığı ortaya konulmuştur [54]. Bir başka çalışmada rimonabantın orta düzey L-DOPA tedavisinin etkisini artırdığı ortaya konulmuş, tedaviye eklenmesi gerektiği öne sürülmüştür [55]. Ancak aynı ilacın kemirgenlerdeki etkisinin aksine, primatlarda antiparkinson aktivite sergilemediği görülmüştür [56]. Konu ile ilişkin vaka raporlarına rastlamak mümkün olsa da, Parkinson hastalığı ile ilişkili olarak kontrollü bir klinik çalışmanın eksikliği literatürde göze çarpmaktadır.

Alzheimer

Alzheimer hastalarından elde edilen beyin dokusu örneklerinde endokannabinoid sistem üyelerinin ekspresyonları incelenmiştir. Amiloid beta lplakları bakımından zengin olan beyin bölgelerinde AEA endokannabinoidinin yıkımından sorumlu olan yağ asidi amid hidrolaz (FAAH) enzimi ile CB2 reseptörünün genlerinin ekspresyonlarında artış kaydedilmiştir. FAAH enzim aktivitesinin de arttığı, ancak CB1 seviyesinin değişmediği belirlenmiştir [57]. Buna ek olarak başka bir çalışmada CB1 reseptör ekspresyonunun azaldığı da ifade edilmiştir [58].

Alzheimer hastalığı ile artan CB2 reseptör ekspresyonu seviyesini ilişkilendiren çalışmaların ardından [59, 60]; yeni terapötik yaklaşımlar için CB2 agonistlerinin kullanımı spesifik olarak hedeflenmiştir. Seçici bir CB2 agonisti olan JWH-015 in vitro olarak gerçekleştirilen bir çalışmada amiloid beta plaklarının insan dokularından uzaklaşmasını sağlamıştır [61].

Selektif bir CB2 agonisti olan MDA-7 etken maddesi, 14 gün süreyle alzheimer hastalığına sahip sıçanlara intraperitoneal yolla uygulanmıştır ve bu sürenin sonunda amiloid beta birikiminde azalma ile kognitif bozuklukta iyileşmeler gözlenmiştir [62].

Reseptör agonisti etken maddelerine ek olarak, bu reseptörlere düşük afiniteye sahip CBD de Alzheimer hastalığı için faydalı etkiler ortaya koymuştur. 7 gün süreyle 2,5 veya 10 mg/kg/gün dozlarında intraperitoneal yolla CBD alan Alzheimer hastalarda amiloid beta birikimi ile uyarılan nöroinflamasyonun azaldığı kaydedilmiştir [63].

Huntington

Huntington hastalığı ile ilişkili beyin bölgelerinde endokannabinoid sisteme dair yapıların ekspresyon seviyelerinin değiştiğine dair pek çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar endokannabinoid sistemin huntington hastalığının patolojisinde rol sahibi olduğunu düşündürmektedir. Huntingtona sahip hastaların beyinlerinin ölüm sonrası incelenmesi ile gerçekleştirilen bir çalışmada bazal ganglia ile özellikle globus pallidusta CB1 reseptörlerinin ekspresyon seviyelerinin %97,5 kadar azaldığı kaydedilmiştir [64, 65]. Kemirgen modellerini içeren huntington çalışmaları da bu sonucu destekler niteliktedir [66-68].

Yapılan bazı klinik çalışmalarda hem oral CBD hem de THC/CBD oromukozal sprey uygulamaları test edilmiştir. Yapılan çalışmalarda huntington hastalarında motor, bilişsel ve fonksiyonel semptomlarda bir iyileşme kaydedilememiştir [69, 70]. Ancak yapılan bir başka klinik pilot çalışmada nabilonun kognitif sorunların giderilmesinde etki kaydedildiği ifade edilmiştir [71].

Kenevir ve Ağrı

Ağrının tedavisi için esrar içerikli kenevirin kullanımı 5000 yıl öncesine dayanmaktadır. Ancak kullanımı bu kadar eskiye dayanıyor olmasına rağmen, etki mekanizmaları ile ilişkili olarak yeterli bilgi mevcut değildir. Kannabinoidler ya da kannabinoid içeren farmasötik preparatlar çoğunlukla somatosensör sistemi etkileyen lezyonlar ile hastalıklarla ilişkili olarak ortaya çıkan nöropatik ağrının hafifletilmesi için kullanılmaktadır [72]. Yapılan çalışmalar THC'nin nöropatik ağrıyı hafifletmek üzere etkili bir ajan olduğunu ortaya koymuştur. Ancak elde edilen verilerde THC'nin endişe verici yan etkileri olduğu kaydedilmiştir [73-75].

Kannabinoidlerin analjezik olarak kullanımı, daha çok opioid gibi diğer analjezik ilaçlara alternatif bulma hedefi dolayısıyla ortaya çıkmıştır. Hava yoluyla kenevirin kullanımının ağrı üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmada artan THC oranıyla birlikte katılımcıların hissettikleri ağrı derecesinin de azaldığını bildirdiği kaydedilmiştir [76]. Genel olarak kenevirin analjezik etkisinin hafif olduğu, özellikle bu amaçla reçete edilen GABA reseptör agonistleri gabapentin ve pregabalin gibi ilaçlar kadar etkili olmadığı ifade edilmektedir. Bu sebeple kenevirin dolayısıyla kannabinoidlerin tek başlarına kullanımı yerine mevcut analjezik ilaçlarla birlikte kullanımının daha etkili olduğu düşünülmektedir. Mevcut ağrı kesici ilaçlarla birlikte kullanılan Sativex™ ticari adıyla bilinen

Nabiximols (Eşit derecede THC ve CBD içerir.) gibi oromukozal spreylelerin ağrı yoğunluğunda önemli ölçüde azalmaya yardımcı olduğu kaydedilmiştir [74, 77, 78].

Tıbbi kenevirin analjezik etkinliği üzerine klinik çalışmaların sistematik olarak sonuçları incelendiğinde, tıbbi kenevirin nöropatik ağrıyı azaltmada akut etkisinin mevcut olduğu ifade edilmiştir. Plasebo ile kıyaslandığında, ağrının giderilmesi noktasında % 30 kadar bir analjezik etkiden söz etmenin mümkün olduğu bir çalışmada, mevcut ağrı kesici ilaçlarla kıyaslama yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir [79].

Romatizmal ağrıların giderilmesinde kannabinoidlerin etkisi ile ilişkili verilerin yeterli düzeyde olmadığı düşünülmektedir. Fibromiyalji, romatoid artrit, kas/iskelet ağrısı gibi durumlarda kullanılan THC/CBD oromukozal spreylelerinin tedavisini araştıran birkaç randomize klinik çalışmada elde edilen veriler, analjezik olarak kullanım amacıyla kannabinoidlerin önerilmesi için yeterli olarak görülmediğini ortaya koymuştur [80, 81].

Kenevir ve Kanser

Çeşitli kanser türlerinde endokannabinoid sistem üyelerinin ekspresyon seviyelerinde değişiklik olduğu kaydedilmiş ve bu değişikliklerin kanser tedavisi için potansiyel bir gelişmeye zemin hazırlayabileceği ifade edilmiştir [82].

Yapılan çalışmalarda hem glioblastoma kanser türünde hem de pediatrik gliomaların erken evrelerinde CB1 reseptörlerinin aşırı seviyede eksprese edildiği kaydedilmiştir [83, 84]. Glioblastomalarda ve astrositomlarda ise CB2 reseptörlerinin yüksek seviyede eksprese edildiği ve bu ekspresyon seviyelerinin tümörün içerisinde bulunduğu evre ile de ilişkili olduğu belirlenmiştir [84-87]. Beyin kanseri hücre hatları (U87, 251, C6, H4) ile gerçekleştirilen bir in vitro çalışmada anandamidin antiproliferatif etki sergilediği tespit edilmiştir. Buna ek olarak aynı materyalin migrasyon ile yayılımını da engellediği belirlenmiştir [88, 89]. Diğer endokannabinoidlerin test edildiği bir başka çalışmada C6 glioma hücrelerinin çoğalmasının kannabinoid reseptörleri aracılığıyla engellendiği kaydedilmiştir [90, 91].

Göğüs kanseri hücrelerinde CB2 reseptörlerinin aşırı ekspresyonu bildirilmiştir. HER-2 pozitif olan göğüs kanseri dokularının %90'ından fazlasında CB2 reseptörlerinin aşırı ekspresyonuna rastlanmıştır [92]. In vitro bir çalışmada test edilen endokannabinoidlerin CB1 reseptörlerini kullanarak meme kanseri hücrelerinde antiproliferatif etki sergilediği gösterilmiştir [93, 94]. Benzer şekilde hem bazı fitokannabinoidlerin (THC ve CBD dahil) hem de sentetik kannabinoidlerin (WIN-55,212-2 ve JWH-133 gibi) kannabinoid reseptörlerini kullanarak antiproliferatif etki sergilediği tespit edilmiştir [95, 96].

Prostat kanseri dokusunun, sağlıklı prostat dokusu ile kıyaslandığında hem CB1 hem de CB2 reseptörlerinin artan ekspresyonuna sahip olduğu belirlenmiştir. CB1 reseptörlerinin aşırı eksprese edilmesinin hem metastaz sıklığını hem de Gleason skorunu etkilediği ifade edilmiştir [97-100].

Gerçekleştirilen çalışmalar kannabinoidlerin prostat kanseri dokusunda antiproliferatif etki sergilediğini ortaya koymuştur. Primer in vitro kültürü gerçekleştirilen prostat kanseri kültürü ile PC-3, DU145, LNCaP prostat hücre hatlarında anandamidin CB1 reseptörünün aracılığı ile antiproliferatif etki sergilediği belirlenmiştir [99, 101, 102].

Hepatokarsinomda endokannabinoid sistem ekspresyon seviyelerinin araştırıldığı çalışmalarda; sağlıklı karaciğer dokusu ile kıyaslandığında hem CB1 hem de CB2 reseptörlerinin sırasıyla 3.07 ve 5.44 kat fazla eksprese edildiği belirlenmiştir. Anadamid ise karaciğer kanser dokusunda endokannabinoid sistem reseptörlerinden bağımsız bir biçimde proliferasyonu engelleyici etki sergilediği kaydedilmiştir [103, 104]. Buna ek olarak fitokannabinoidler ile sentetik kannabinoidlerin sitotoksik etkilerinin CB2 reseptörleri aracılığıyla gerçekleştiği tespit edilmiştir [105-107].

Kenevir ve Bulantı/Kusma

Kenevir bulantı kusma tedavisi için ilk defa 1975'te yapılan bir çalışma ile kemoterapi alan hastalarda test edilmiştir. THC'nin oral formunun antiemetik özelliklerini araştıran çalışmada, ilgili maddenin bulantının tedavisinde etkili bir ajan olduğu tespit edilmiştir [108].

Sivri fare (*Cryptotis parva*) hayvan modelinde yapılan bir çalışmada CB1 reseptörlerinin antiemetik etkinlikteki rolü tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla CB1 reseptörlerinin spesifik antagonistler kullanılarak antagonize edilmesinin kusmaya sebep olduğu kaydedilmiştir. CB1 reseptörüne spesifik olan seçici agonistlerin (Δ^9 -THC, CP 55,940 ve WIN 55,212-2 kullanımıyla kusma etkisi geri döndürülebilmektedir [109].

Gerçekleştirilen farklı çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Fare hayvan modelinde sisplatin kaynaklı kusmanın tedavisinde intraperitoneal olarak uygulanan Δ^9 -THC'nin, hem farelerde kusmayı hem de kusma sıklığını azalttığı belirlenmiştir. Aynı çalışma sivri fare (*Cryptotis parva*) hayvan modelinde de benzer sonuçlar ortaya koymuştur [110].

Yapılan bir klinik çalışmada bulantı ve kusmanın kontrolünde Nabilonun (CesametTM) (1 mg) etkisi test edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre kemoterapi öncesinde ve kemoterapi esnasında oral olarak kullanılan proklorperazin veya domperidon (20 mg) ilaçlarına kıyasla Nabilonun daha etkili olduğu belirlenmiştir [111]. Kemoterapiye bağlı bulantı ve kusmayı engelleme amacıyla gerçekleştirilen bir klinik çalışmada MarinolTM, SyndrosTM ticari preparatları içerisinde de yer alan Dronabinol etken maddesi test edilmiştir. Oral yoldan kullanılan Dronabinolün (2,5 mg) intravenöz olarak uygulaması gerçekleştirilen ondansetronla (16 mg) kıyaslandığında benzer etki sergilediği görülmüştür. Her iki ilaç da birlikte kullanıldığında elde edilen etkide bir artış gözlenmediği ifade edilmiştir [112].

Lösemi, lenfomalar, beyin karsinomları dahil pek çok kanser türüne sahip 18 yaş altı çocuklarla gerçekleştirilen bir çalışmada, kemoterapi kaynaklı bulantı ve kusmanın tedavisinde nabilonun etkisi incelenmiştir. Tedavide uygulanan antiemetik ajanla kombine olarak kullanılan oral uygulanan Nabilonun antiemetik etkisinin zayıf olduğu tespit edilmiştir. Kannabinoidlerin diğer yaygın etkileri

(baş dönmesi, öfori, gevşeme vb.) Nabilon alan hastalarda tespit edilmiştir. Elde edilen bu verilerin farklı olmasının uygulanan kemoterapi programlarıyla ilişkili olduğu düşünülmüştür [113].

Ameliyat sonrası bulantı kusma tedavisi için kannabinoidlerin etkisinin incelendiği bir çalışmada, $\Delta 9$ -THC'nin intravenöz uygulamalarının hedeflenen antiemetik etkiye ulaşmadığı kaydedilmiştir. $\Delta 9$ -THC düşük antiemetik etkinin yanında, hastalarda psikotropik yan etkiler de ortaya çıkarmıştır [114].

Kenevir ve İnflamasyon

Cannabis sativa L. içeriğinde yer alan kannabinoidler anti-inflamatuar potansiyellerinin belirlenmesi adına araştırmalara konu olmaktadır. Anti-inflamatuar etkinlik olarak kenevir içeriğinde yer alan kannabinoidlerden hem $\Delta 9$ -THC'nin hem de CBD gibi psikoaktif olmayan kannabinoidlerin rol üstlendiği belirlenmiştir.

CBD'nin anti-inflamatuar etkisinin kannabinoid reseptörleri, adenosin A2A reseptörleri, TRPV1 reseptörleri, GPR55 reseptörleri CB2/5HT1A heterodimerizasyonu üzerinden etki gösterebileceği düşünülmektedir [115]. Sıçanlarda kimyasal katkı maddesi E-407 (Karragenan) ile indüklenen bir inflamasyon modelinde CBD'nin COX aktivitesini, PGE2, nitrik oksit ve monoaldehit üretimini de azalttığı kaydedilmiştir [116]. Buna ek olarak CBD'nin HaCaT hücreleri kullanılarak oluşturulan in vitro alerjik dermatit modelinde sitokin üretimini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir [117].

Bağışıklık sisteminin aktif hücreleri arasında yer alan monositler, makrofajlar, bazofiller, lenfositler, dendritic hücreler gibi hücrelerde endokannabinoid sistem ürünlerine, enzimlerine ve reseptörlerine rastlanmıştır. Kannabinoidlerin bu hücreler üzerindeki rollerinin bağışıklık sistemini otokrin ve parakrin olarak module etmek olduğu bilinmektedir [118].

Sentetik kannabinoid olan JWH-018'in CB2 reseptörleri üzerindeki tam agonist etkisi aracılığıyla immün sistemin düzenlenmesinde hatta immün sistemin baskılanmasında rol sahibi olduğu ifade edilmektedir. Hatta bu sentetik kannabinoidin indometazinle kıyaslandığında daha yüksek anti-inflamatuar yanıt oluşturduğu kaydedilmiştir [119]. Yine aynı sentetik kannabinoid analogunun araştırıldığı bir diğer çalışmada Hepatit B virüsüne karşı antikor yanıtının oluşturulmasında ve bu yanıtın şiddetinin belirlenmesinde test edilen JWH-018 kannabinoidinin etkili olduğu belirlenmiştir [120].

Kenevir ve Toksikite

Kenevir preparatlarının, özellikle sentetik kannabinoidlerin kullanımından dolayı gelişen komplikasyonlar da mevcuttur. Kullanıma bağlı olarak anksiyete, uyku bozuklukları, hiperaktivite, ajitasyon, agresiflik gibi semptomlar bildirilmiştir. Akut intoksikasyon durumunda kısa süreli hafıza kaybı gibi bilişsel bozuklukların görüldüğü kaydedilmiştir. Manik durumlara rastlanabileceği gibi, paranoya, intihar eğilimleri gibi durumlara da sebebiyet verme ihtimallerinin mevcut olduğu ifade edilmektedir [121].

İçeriğinde CBD yer alan preparatların $\Delta 9$ -THC'nin CB1 ve CB2 reseptörleri üzerinden gerçekleştirdiği fizyolojik ve toksikolojik etkilerin daha dengeli bir profil sergilediği görülmektedir. Sentetik kannabinoid preparatlarının CBD içerip içermemesi kadar, CB1 ve CB2 reseptörlerine yönelik daha yüksek afinite sergiliyor olmaları da farklı farmakolojik, fizyolojik ve toksikolojik etkinliklerini açıklar niteliktedir [121].

Kenevir preparatlarının intoksikasyonu durumunda hem çocuklar hem de yetişkinlerde tipik olarak hipertansiyon, taşikardi, nystagmus, solunuma dair sıkıntılar, uyku hali, ataksi, konuşma bozukluğu gibi anormalliklere rastlanmaktadır. Bebeklerde ise intoksikasyon durumunda ensefelopatiden açık komaya kadar değişen aralıkta semptomlar görülebilmektedir [122].

Son dönemlerde genellikle sentetik kannabinoid analoglarının kullanımı dolayısıyla intoksikasyon vaka sayılarının artışı dikkat çekmektedir. Intoksikasyon durumlarında genellikle vakaların hipertansiyon, taşikardi, halüsinasyon ve ajitasyon bulguları ortaya koyduğu görülmektedir [123].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Elde edilen tüm bu bulguların ardından sonuç olarak; kenevir antik çağlardan bugüne tedavi maksatlı olarak pek çok kullanım imkanına sahip olmuştur. Kenevirin daha yaygın kullanıma sahip olmasının önüne psikoaktif özelliklere sahip olan $\Delta 9$ -THC fitokannabinoidi geçmiştir. Bu sebeple çeşitli sınırlamalara maruz kalan kenevirin, günümüzde dikkat ve özenle hazırlanmış formülasyonlar ile psikoaktif özelliklerden arı bir şekilde terapötik etkinlik sergileyen preparatları da mevcuttur.

Nöropatik ağrıdan kansere, nörodejeneratif hastalıklardan bulantı/kusmaya kadar geniş bir hastalık skalasında araştırmalara konu olan kenevir, umut verici sonuçlar sergilemiştir. Gerçekleştirilen araştırmaların büyük çoğunluğu deneysel fazda yer alırken, daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulan terapötik endikasyonlardan da söz etmek mümkündür. Kenevir içeriğindeki fitokannabinoid bileşenlerinden $\Delta 9$ -THC'nin MS hastalığında gözlenen kas spastisitesi ile kemoterapiye bağlı bulantı ve kusmada etkili olduğu, nöropatik ağrı tedavisinde de faydalı olabileceği belirlenmiştir. Aynı şekilde bir diğer fitokannabinoid olan CBD'nin ise epilepside faydalı veriler ortaya koyduğu görülmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda ilgili endikasyonlar için kenevir temelli ilaçların onaylandığı bilinmektedir.

Sonuç olarak, kenevir ve içeriğindeki fitokannabinoidler terapötik etkinlik bakımından oldukça geniş yelpazede endikasyona hitap etmesi ile tıp dünyasının yoğun bir biçimde ilgisini çekmektedir. İçerdiği psikoaktif bileşenlere rağmen, uygun dozlarla doğru bir biçimde standardize edilmiş preparatların, kenevirin terapötik bir ajan olarak değerlendirilmesi yolculuğunda önemli bir mihenk taşı olacağı düşünülmektedir. Fitokannabinoidler ve kenevir ile ilişkili olarak; hem farklı endikasyonlar için hem de aynı endikasyonlarda daha kapsamlı, daha ayrıntılı veriler elde etmek için daha fazla çalışma ve araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

İçerdiği fitokannabinoidlerle tıbbi yönden pek çok patolojik durumla ilişkilendirilebilen kenevir bitkisi, son dönemde tıp dünyasının literatür verilerinde kendisine sıklıkla yer bulmuştur. Bugüne kadar elde edilen verilere ek olarak, kenevir ve cannabinoidlere dair henüz gün yüzüne çıkarılmamış bilgiler göz önüne alındığında kenevirin terapötik potansiyelinin oldukça yüksek olduğu öngörülmektedir. Bu sebeptendir ki; kenevirin gelecek yıllarda hem sahip olduğu potansiyel dolayısıyla artan bir ilgiyle karşılaşmaya devam edeceği hem de bilimsel araştırmalarda sıklıkla kendisine yer bulacağı düşünülmektedir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: Ö.B., S.A.; Tasarım: Ö.B., S.A.; Denetim: S.A.; Kaynaklar: S.A.; Malzemeler: Ö.B.; Veri Toplama ve/veya işleme: Ö.B.; Analiz ve/veya yorumlama: S.A.; Literatür taraması: Ö.B.; Makalenin yazılması: Ö.B., S.A.; Kritik inceleme: Ö.B., S.A.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

1. Maule, W. J. (2015). Medical uses of marijuana (Cannabis sativa): fact or fallacy? *British Journal of Biomedical Science*, 72(2), 85-91. [\[CrossRef\]](#)
2. Zuardi, A. W. (2006). History of cannabis as a medicine: a review. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 28, 153-157. [\[CrossRef\]](#)
3. Kalant, H. (2001). Medicinal use of cannabis: history and current status. *Pain Res Manag*, 6(2), 80-91. [\[CrossRef\]](#)
4. Touw, M. (1981). The Religious and Medicinal Uses of Cannabis in China, India and Tibet. *Journal of Psychoactive Drugs*, 13(1), 23-34. [\[CrossRef\]](#)
5. Pisanti, S., Bifulco, M. (2017). Modern History of Medical Cannabis: From Widespread Use to Prohibitionism and Back. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(3), 195-198. [\[CrossRef\]](#)
6. Amin, M. R., Ali, D. W. (2019). Pharmacology of Medical Cannabis. *Adv Exp Med Biol*, 1162, 151-165. [\[CrossRef\]](#)
7. Turan, M., (2000). *Lif Bitkileri*. Bursa: Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü,.

8. Aydoğan, M., Terzi, Y. E., Gizlenci, Ş., Acar, M., Esen, A., Meral, H. (2020). Türkiye’de kenevir yetiştiriciliğinin ekonomik olarak yapılabilirliği: Samsun ili Vezirköprü ilçesi örneği. *ANADOLU JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES*, 35, 35-50. [\[CrossRef\]](#)
9. Ağar, Osman T. (2019). "Cannabis’e Tarihsel Bir Bakış." *Estüdam Halk Sağlığı Dergisi* , pp.7-11.
10. Koca Çalışkan, U, Yıldırım, S . (2020) "Kenevir Ve Sağlık Alanında Kullanımı" . *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 44: 112-136. [\[CrossRef\]](#)
11. Onay, A., Yıldırım, H., Ekinçi, R. (2020). *Kenevir, Cannabis sativa L.* Ankara: Palme Yayınevi.
12. ElSohly, M. A., Radwan, M. M., Gul, W., Chandra, S., Galal, A. (2017). Phytochemistry of Cannabis sativa L. *Prog Chem Org Nat Prod*, 103, 1-36. [\[CrossRef\]](#)
13. Pertwee, R. G. (2008). The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *British journal of pharmacology*, 153(2), 199-215. [\[CrossRef\]](#)
14. Crippa, J. A., Zuardi, A. W., Martín-Santos, R., Bhattacharyya, S., Atakan, Z., McGuire, P., Fusar-Poli, P. (2009). Cannabis and anxiety: a critical review of the evidence. *Hum Psychopharmacol*, 24(7), 515-523. [\[CrossRef\]](#)
15. Zuardi, A. W., Morais, S. L., Guimarães, F. S., Mechoulam, R. (1995). Antipsychotic effect of cannabidiol. *J Clin Psychiatry*, 56(10), 485-486. [\[CrossRef\]](#)
16. Mechoulam, R., Peters, M., Murillo-Rodriguez, E., Hanus, L. O. (2007). Cannabidiol--recent advances. *Chem Biodivers*, 4(8), 1678-1692. [\[CrossRef\]](#)
17. Console-Bram, L., Marcu, J., Abood, M. E. (2012). Cannabinoid receptors: nomenclature and pharmacological principles. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 38(1), 4-15. [\[CrossRef\]](#)
18. Svíženská, I., Dubový, P., Šulcová, A. (2008). Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures — A short review. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 90(4), 501-511. [\[CrossRef\]](#)
19. Kendall, D. A., Yudowski, G. A. (2017). Cannabinoid Receptors in the Central Nervous System: Their Signaling and Roles in Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10(294). [\[CrossRef\]](#)
20. Szulakowska, A., Milnerowicz, H. (2007). Cannabis sativa in the Light of Scientific Research. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 16, 807-815.
21. Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Gong, J.-P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P. A., Uhl, G. R. (2006). Discovery of the Presence and Functional Expression of Cannabinoid CB2 Receptors in Brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1074(1), 514-536. [\[CrossRef\]](#)
22. Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Sharkey, K. A. (2005). Identification and Functional Characterization of Brainstem Cannabinoid CB₂ Receptors. *Science*, 310(5746), 329-332. [\[CrossRef\]](#)
23. Henstridge, C. M. (2012). Off-Target Cannabinoid Effects Mediated by GPR55. *Pharmacology*, 89(3-4), 179-187. [\[CrossRef\]](#)

24. Katchan, V., David, P., Shoenfeld, Y. (2016). Cannabinoids and autoimmune diseases: A systematic review. *Autoimmunity Reviews*, 15(6), 513-528. [\[CrossRef\]](#)
25. Laprairie, R. B., Bagher, A. M., Denovan-Wright, E. M. (2017). Cannabinoid receptor ligand bias: implications in the central nervous system. *Current Opinion in Pharmacology*, 32, 32-43. [\[CrossRef\]](#)
26. Cunha, P., Romão, A., Mascarenhas-Melo, F., Teixeira, H., Reis, F. (2011). Endocannabinoid system in cardiovascular disorders - new pharmacotherapeutic opportunities. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 3(3), 350-360. [\[CrossRef\]](#)
27. Pagotto, U., Marsicano, G., Cota, D., Lutz, B., Pasquali, R. (2006). The Emerging Role of the Endocannabinoid System in Endocrine Regulation and Energy Balance. *Endocrine Reviews*, 27(1), 73-100. doi:10.1210/er.2005-0009
28. Bridgeman, M. B., Abazia, D. T. (2017). Medicinal Cannabis: History, Pharmacology, And Implications for the Acute Care Setting. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 42(3), 180-188. [\[CrossRef\]](#)
29. Di Marzo, V. (2008). Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov*, 7(5), 438-455. [\[CrossRef\]](#)
30. Pacher, P., Mechoulam, R. (2011). Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? *Progress in Lipid Research*, 50(2), 193-211. [\[CrossRef\]](#)
31. Hasenoehrl, C., Taschler, U., Storr, M., Schicho, R. (2016). The gastrointestinal tract – a central organ of cannabinoid signaling in health and disease. *Neurogastroenterology & Motility*, 28(12), 1765-1780. [\[CrossRef\]](#)
32. Ligresti, A., Petrocellis, L. D., Marzo, V. D. (2016). From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. *Physiological Reviews*, 96(4), 1593-1659. [\[CrossRef\]](#)
33. Benito, C., Romero, J. P., Tolón, R. M., Clemente, D., Docagne, F., Hillard, C. J., Romero, J. (2007). Cannabinoid CB₁ and CB₂ Receptors and Fatty Acid Amide Hydrolase Are Specific Markers of Plaque Cell Subtypes in Human Multiple Sclerosis. *The Journal of Neuroscience*, 27(9), 2396. [\[CrossRef\]](#)
34. Jean-Gilles, L., Feng, S., Tench, C. R., Chapman, V., Kendall, D. A., Barrett, D. A., Constantinescu, C. S. (2009). Plasma endocannabinoid levels in multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 287(1), 212-215. [\[CrossRef\]](#)
35. Killestein, J., Hoogervorst, E. L., Reif, M., Kalkers, N. F., Van Loenen, A. C., Staats, P. G., Polman, C. H. (2002). Safety, tolerability, and efficacy of orally administered cannabinoids in MS. *Neurology*, 58(9), 1404-1407. [\[CrossRef\]](#)
36. Ungerleider, J. T., Andyrsiak, T., Fairbanks, L., Ellison, G. W., Myers, L. W. (1987). Delta-9-THC in the treatment of spasticity associated with multiple sclerosis. *Adv Alcohol Subst Abuse*, 7(1), 39-50. [\[CrossRef\]](#)

37. Zajicek, J. P., Hobart, J. C., Slade, A., Barnes, D., Mattison, P. G. (2012). Multiple Sclerosis and Extract of Cannabis: results of the MUSEC trial. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 83(11), 1125. [\[CrossRef\]](#)
38. Collin, C., Ehler, E., Waberzinek, G., Alsindi, Z., Davies, P., Powell, K., Ambler, Z. (2010). A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of Sativex, in subjects with symptoms of spasticity due to multiple sclerosis. *Neurological Research*, 32(5), 451-459. [\[CrossRef\]](#)
39. Wade, D. T., Makela, P., Robson, P., House, H., Bateman, C. (2004). Do cannabis-based medicinal extracts have general or specific effects on symptoms in multiple sclerosis? A double-blind, randomized, placebo-controlled study on 160 patients. *Multiple Sclerosis Journal*, 10(4), 434-441. [\[CrossRef\]](#)
40. Rog, D. J., Nurmikko, T. J., Young, C. A. (2007). Oromucosal Δ^9 -tetrahydrocannabinol/cannabidiol for neuropathic pain associated with multiple sclerosis: An uncontrolled, open-label, 2-year extension trial. *Clinical Therapeutics*, 29(9), 2068-2079. [\[CrossRef\]](#)
41. Wallace, M. J., Blair, R. E., Falenski, K. W., Martin, B. R., DeLorenzo, R. J. (2003). The Endogenous Cannabinoid System Regulates Seizure Frequency and Duration in a Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307(1), 129. [\[CrossRef\]](#)
42. Ellison, J. M., Gelwan, E., Ogletree, J. (1990). Complex partial seizure symptoms affected by marijuana abuse. *J Clin Psychiatry*, 51(10), 439-440. [\[CrossRef\]](#)
43. Gross, D. W., Hamm, J., Ashworth, N. L., Quigley, D. (2004). Marijuana use and epilepsy: prevalence in patients of a tertiary care epilepsy center. *Neurology*, 62(11), 2095-2097. [\[CrossRef\]](#)
44. Mortati, K., Dworetzky, B., Devinsky, O. (2007). Marijuana: an effective antiepileptic treatment in partial epilepsy? A case report and review of the literature. *Rev Neurol Dis*, 4(2), 103-106.
45. Hamerle, M., Ghaeni, L., Kowski, A., Weissinger, F., Holtkamp, M. (2014). Cannabis and other illicit drug use in epilepsy patients. *European Journal of Neurology*, 21(1), 167-170. [\[CrossRef\]](#)
46. Hussain, S. A., Zhou, R., Jacobson, C., Weng, J., Cheng, E., Lay, J., Sankar, R. (2015). Perceived efficacy of cannabidiol-enriched cannabis extracts for treatment of pediatric epilepsy: A potential role for infantile spasms and Lennox–Gastaut syndrome. *Epilepsy & Behavior*, 47, 138-141. [\[CrossRef\]](#)
47. Porter, B. E., Jacobson, C. (2013). Report of a parent survey of cannabidiol-enriched cannabis use in pediatric treatment-resistant epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 29(3), 574-577. [\[CrossRef\]](#)
48. Gofshteyn, J. S., Wilfong, A., Devinsky, O., Bluvstein, J., Charuta, J., Ciliberto, M. A., Marsh, E. D. (2017). Cannabidiol as a Potential Treatment for Febrile Infection-Related Epilepsy Syndrome (FIRES) in the Acute and Chronic Phases. *Journal of Child Neurology*, 32(1), 35-40. [\[CrossRef\]](#)
49. Suraev, A., Lintzeris, N., Stuart, J., Kevin, R. C., Blackburn, R., Richards, E., McGregor, I. S. (2018). Composition and Use of Cannabis Extracts for Childhood Epilepsy in the Australian Community. *Scientific Reports*, 8(1), 10154. [\[CrossRef\]](#)

50. Stampanoni Bassi M., (2017). Cannabinoids in Parkinson's Disease.. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2(1), 21-29. [\[CrossRef\]](#)
51. Basavarajappa, B. S., Shivakumar, M., Joshi, V., Subbanna, S. (2017). Endocannabinoid system in neurodegenerative disorders. *J Neurochem*, 142(5), 624-648. [\[CrossRef\]](#)
52. Hurley, M. J., Mash, D. C., Jenner, P. (2003b). Expression of cannabinoid CB1 receptor mRNA in basal ganglia of normal and parkinsonian human brain. *J Neural Transm (Vienna)*, 110(11), 1279-1288. [\[CrossRef\]](#)
53. Hurley, M. J., Mash, D. C., Jenner, P. (2003a). Expression of cannabinoid CB1 receptor mRNA in basal ganglia of normal and parkinsonian human brain. *Journal of Neural Transmission*, 110(11), 1279-1288. [\[CrossRef\]](#)
54. El Banoua, F., Caraballo, I., Flores, J. A., Galan-Rodriguez, B., Fernandez-Espejo, E. (2004). Effects on turning of microinjections into basal ganglia of D1 and D2 dopamine receptors agonists and the cannabinoid CB1 antagonist SR141716A in a rat Parkinson's model. *Neurobiology of Disease*, 16(2), 377-385. [\[CrossRef\]](#)
55. Kelsey, J. E., Harris, O., Cassin, J. (2009). The CB1 antagonist rimonabant is adjunctively therapeutic as well as monotherapeutic in an animal model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*, 203(2), 304-307. [\[CrossRef\]](#)
56. Meschler, J. P., Howlett, A. C., Madras, B. K. (2001). Cannabinoid receptor agonist and antagonist effects on motor function in normal and 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated non-human primates. *Psychopharmacology (Berl)*, 156(1), 79-85. [\[CrossRef\]](#)
57. Benito, C., Núñez, E., Tolón, R. M., Carrier, E. J., Rábano, A., Hillard, C. J., Romero, J. (2003). Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci*, 23(35), 11136-11141. [\[CrossRef\]](#)
58. Ramírez, B. G., Blázquez, C., del Pulgar, T. G., Guzmán, M., de Ceballos, M. L. (2005). Prevention of Alzheimer's Disease Pathology by Cannabinoids: Neuroprotection Mediated by Blockade of Microglial Activation. *The Journal of Neuroscience*, 25(8), 1904. [\[CrossRef\]](#)
59. Koppel, J., Vingtdeux, V., Marambaud, P., d'Abramo, C., Jimenez, H., Stauber, M., Davies, P. (2014). CB2 Receptor Deficiency Increases Amyloid Pathology and Alters Tau Processing in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Molecular Medicine*, 20(1), 29-36. [\[CrossRef\]](#)
60. Solas, M., Francis, P. T., Franco, R., Ramirez, M. J. (2013). CB2 receptor and amyloid pathology in frontal cortex of Alzheimer's disease patients. *Neurobiology of Aging*, 34(3), 805-808. [\[CrossRef\]](#)
61. Tolón, R. M., Núñez, E., Pazos, M. R., Benito, C., Castillo, A. I., Martínez-Orgado, J. A., Romero, J. (2009). The activation of cannabinoid CB2 receptors stimulates in situ and in vitro beta-amyloid removal by human macrophages. *Brain Research*, 1283, 148-154. [\[CrossRef\]](#)

62. Wu, J., Bie, B., Yang, H., Xu, J. J., Brown, D. L., Naguib, M. (2013). Activation of the CB2 receptor system reverses amyloid-induced memory deficiency. *Neurobiology of Aging*, 34(3), 791-804. [\[CrossRef\]](#)
63. Esposito, G., Scuderi, C., Savani, C., Steardo Jr, L., De Filippis, D., Cottone, P., Steardo, L. (2007). Cannabidiol in vivo blunts β -amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1 β and iNOS expression. *British journal of pharmacology*, 151(8), 1272-1279. [\[CrossRef\]](#)
64. Glass, M., Faull, R. L., Dragunow, M. (1993). Loss of cannabinoid receptors in the substantia nigra in Huntington's disease. *Neuroscience*, 56(3), 523-527. [\[CrossRef\]](#)
65. Richfield, E. K., Herkenham, M. (1994). Selective vulnerability in Huntington's disease: Preferential loss of cannabinoid receptors in lateral globus pallidus. *Annals of Neurology*, 36(4), 577-584. [\[CrossRef\]](#)
66. Denovan-Wright, E. M., Robertson, H. A. (2000). Cannabinoid receptor messenger RNA levels decrease in a subset of neurons of the lateral striatum, cortex and hippocampus of transgenic Huntington's disease mice. *Neuroscience*, 98(4), 705-713. [\[CrossRef\]](#)
67. Dowie, M. J., Bradshaw, H. B., Howard, M. L., Nicholson, L. F., Faull, R. L., Hannan, A. J., Glass, M. (2009). Altered CB1 receptor and endocannabinoid levels precede motor symptom onset in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neuroscience*, 163(1), 456-465. [\[CrossRef\]](#)
68. McCaw, E. A., Hu, H., Gomez, G. T., Hebb, A. L., Kelly, M. E., Denovan-Wright, E. M. (2004). Structure, expression and regulation of the cannabinoid receptor gene (CB1) in Huntington's disease transgenic mice. *Eur J Biochem*, 271(23-24), 4909-4920. [\[CrossRef\]](#)
69. Consroe, P., Laguna, J., Allender, J., Snider, S., Stern, L., Sandyk, R., Schram, K. (1991). Controlled clinical trial of cannabidiol in Huntington's disease. *Pharmacol Biochem Behav*, 40(3), 701-708. [\[CrossRef\]](#)
70. López-Sendón Moreno, J. L., García Caldentey, J., Trigo Cubillo, P., Ruiz Romero, C., García Ribas, G., Alonso Arias, M. A. A., García de Yébenes Prous, J. (2016). A double-blind, randomized, cross-over, placebo-controlled, pilot trial with Sativex in Huntington's disease. *Journal of Neurology*, 263(7), 1390-1400. [\[CrossRef\]](#)
71. Curtis, A., Mitchell, I., Patel, S., Ives, N., Rickards, H. (2009). A pilot study using nabilone for symptomatic treatment in Huntington's disease. *Movement Disorders*, 24(15), 2254-2259. [\[CrossRef\]](#)
72. Alles, S. R. A., Smith, P. A. (2018). Etiology and Pharmacology of Neuropathic Pain. *Pharmacol Rev*, 70(2), 315-347. [\[CrossRef\]](#)
73. Abrams, D. I., Jay, C. A., Shade, S. B., Vizoso, H., Reda, H., Press, S., Petersen, K. L. (2007). Cannabis in painful HIV-associated sensory neuropathy: a randomized placebo-controlled trial. *Neurology*, 68(7), 515-521. [\[CrossRef\]](#)
74. Ellis, R. J., Toperoff, W., Vaida, F., van den Brande, G., Gonzales, J., Gouaux, B., Atkinson, J. H. (2009). Smoked medicinal cannabis for neuropathic pain in HIV: a randomized, crossover clinical trial. *Neuropsychopharmacology*, 34(3), 672-680. [\[CrossRef\]](#)

75. Wilsey, B., Marcotte, T., Tsodikov, A., Millman, J., Bentley, H., Gouaux, B., Fishman, S. (2008). A randomized, placebo-controlled, crossover trial of cannabis cigarettes in neuropathic pain. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*, 9(6), 506-521. [\[CrossRef\]](#)
76. Borgelt, L. M., Franson, K. L., Nussbaum, A. M., Wang, G. S. (2013). The pharmacologic and clinical effects of medical cannabis. *Pharmacotherapy*, 33(2), 195-209. [\[CrossRef\]](#)
77. Nurmikko, T. J., Serpell, M. G., Hoggart, B., Toomey, P. J., Morlion, B. J., Haines, D. (2007). Sativex successfully treats neuropathic pain characterised by allodynia: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Pain*, 133(1-3), 210-220. [\[CrossRef\]](#)
78. Rog, D. J., Nurmikko, T. J., Young, C. A. (2007). Oromucosal delta9-tetrahydrocannabinol/cannabidiol for neuropathic pain associated with multiple sclerosis: an uncontrolled, open-label, 2-year extension trial. *Clin Ther*, 29(9), 2068-2079. [\[CrossRef\]](#)
79. Häuser, W., Fitzcharles, M. A., Radbruch, L., Petzke, F. (2017). Cannabinoids in Pain Management and Palliative Medicine. *Dtsch Arztebl Int*, 114(38), 627-634. [\[CrossRef\]](#)
80. Fitzcharles, M. A., Baerwald, C., Ablin, J., Häuser, W. (2016). Efficacy, tolerability and safety of cannabinoids in chronic pain associated with rheumatic diseases (fibromyalgia syndrome, back pain, osteoarthritis, rheumatoid arthritis): A systematic review of randomized controlled trials. *Schmerz*, 30(1), 47-61. [\[CrossRef\]](#)
81. Fitzcharles, M. A., Ste-Marie, P. A., Häuser, W., Clauw, D. J., Jamal, S., Karsh, J., Walsh, Z. (2016). Efficacy, Tolerability, and Safety of Cannabinoid Treatments in the Rheumatic Diseases: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 68(5), 681-688. [\[CrossRef\]](#)
82. Fraguas-Sánchez, A. I., Martín-Sabroso, C., Torres-Suárez, A. I. (2018). Insights into the effects of the endocannabinoid system in cancer: a review. *British journal of pharmacology*, 175(13), 2566-2580. [\[CrossRef\]](#)
83. Sredni, S. T., Huang, C.-C., Suzuki, M., Pundy, T., Chou, P., Tomita, T. (2016). Spontaneous involution of pediatric low-grade gliomas: high expression of cannabinoid receptor 1 (CNR1) at the time of diagnosis may indicate involvement of the endocannabinoid system. *Child's Nervous System*, 32(11), 2061-2067. [\[CrossRef\]](#)
84. Wu, X., Han, L., Zhang, X., Li, L., Jiang, C., Qiu, Y., Fu, J. (2012). Alteration of endocannabinoid system in human gliomas. *Journal of Neurochemistry*, 120(5), 842-849. [\[CrossRef\]](#)
85. Ellert-Miklaszewska, A., Grajkowska, W., Gabrusiewicz, K., Kaminska, B., Konarska, L. (2007). Distinctive pattern of cannabinoid receptor type II (CB2) expression in adult and pediatric brain tumors. *Brain Res*, 1137(1), 161-169. [\[CrossRef\]](#)
86. Sánchez, C., de Ceballos, M. L., Gomez del Pulgar, T., Rueda, D., Corbacho, C., Velasco, G., Guzmán, M. (2001). Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Res*, 61(15), 5784-5789.
87. Schley, M., Ständer, S., Kerner, J., Vajkoczy, P., Schüpfer, G., Dusch, M., Konrad, C. (2009). Predominant CB2 receptor expression in endothelial cells of glioblastoma in humans. *Brain Res Bull*, 79(5), 333-337. [\[CrossRef\]](#)

88. Hohmann, T., Grabiec, U., Ghadban, C., Feese, K., Dehghani, F. (2017). The influence of biomechanical properties and cannabinoids on tumor invasion. *Cell adhesion & migration*, 11(1), 54-67. [\[CrossRef\]](#)
89. Ma, C., Wu, T.-T., Jiang, P.-C., Li, Z.-Q., Chen, X.-J., Fu, K., Gong, R. (2016). Anti-carcinogenic activity of anandamide on human glioma in vitro and in vivo. *Molecular medicine reports*, 13(2), 1558-1562. [\[CrossRef\]](#)
90. Fowler, C. J., Jonsson, K. O., Andersson, A., Juntunen, J., Järvinen, T., Vandevoorde, S., Smart, D. (2003). Inhibition of C6 glioma cell proliferation by anandamide, 1-arachidonoylglycerol, and by a water soluble phosphate ester of anandamide: variability in response and involvement of arachidonic acid. *Biochem Pharmacol*, 66(5), 757-767. [\[CrossRef\]](#)
91. Jacobsson, S. O., Wallin, T., Fowler, C. J. (2001). Inhibition of rat C6 glioma cell proliferation by endogenous and synthetic cannabinoids. Relative involvement of cannabinoid and vanilloid receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 299(3), 951-959. [\[CrossRef\]](#)
92. Caffarel, M. M., Andradas, C., Mira, E., Pérez-Gómez, E., Cerutti, C., Moreno-Bueno, G., Sánchez, C. (2010). Cannabinoids reduce ErbB2-driven breast cancer progression through Akt inhibition. *Mol Cancer*, 9, 196. [\[CrossRef\]](#)
93. Bisogno, T., Katayama, K., Melck, D., Ueda, N., De Petrocellis, L., Yamamoto, S., Di Marzo, V. (1998). Biosynthesis and degradation of bioactive fatty acid amides in human breast cancer and rat pheochromocytoma cells—implications for cell proliferation and differentiation. *Eur J Biochem*, 254(3), 634-642. [\[CrossRef\]](#)
94. Melck, D., De Petrocellis, L., Orlando, P., Bisogno, T., Laezza, C., Bifulco, M., Di Marzo, V. (2000). Suppression of nerve growth factor Trk receptors and prolactin receptors by endocannabinoids leads to inhibition of human breast and prostate cancer cell proliferation. *Endocrinology*, 141(1), 118-126. [\[CrossRef\]](#)
95. Ligresti, A., Moriello, A. S., Starowicz, K., Matias, I., Pisanti, S., De Petrocellis, L., Di Marzo, V. (2006). Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther*, 318(3), 1375-1387. [\[CrossRef\]](#)
96. Qamri, Z., Preet, A., Nasser, M. W., Bass, C. E., Leone, G., Barsky, S. H., Ganju, R. K. (2009). Synthetic cannabinoid receptor agonists inhibit tumor growth and metastasis of breast cancer. *Mol Cancer Ther*, 8(11), 3117-3129. [\[CrossRef\]](#)
97. Chung, S. C., Hammarsten, P., Josefsson, A., Stattin, P., Granfors, T., Egevad, L., Fowler, C. J. (2009). A high cannabinoid CB(1) receptor immunoreactivity is associated with disease severity and outcome in prostate cancer. *Eur J Cancer*, 45(1), 174-182. [\[CrossRef\]](#)
98. Cipriano, M., Häggström, J., Hammarsten, P., Fowler, C. J. (2013). Association between Cannabinoid CB1 Receptor Expression and Akt Signalling in Prostate Cancer. *PLoS One*, 8(6), e65798. [\[CrossRef\]](#)
99. Orellana-Serradell, O., Poblete, C. E., Sanchez, C., Castellón, E. A., Gallegos, I., Huidobro, C., Contreras, H. R. (2015). Proapoptotic effect of endocannabinoids in prostate cancer cells. *Oncol Rep*, 33(4), 1599-1608. [\[CrossRef\]](#)

100. Sarfaraz, S., Afaq, F., Adhami, V. M., Mukhtar, H. (2005). Cannabinoid receptor as a novel target for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res*, 65(5), 1635-1641. [\[CrossRef\]](#)
101. Mimeault, M., Pommery, N., Watzet, N., Bailly, C., Hénichart, J. P. (2003). Anti-proliferative and apoptotic effects of anandamide in human prostatic cancer cell lines: implication of epidermal growth factor receptor down-regulation and ceramide production. *Prostate*, 56(1), 1-12. [\[CrossRef\]](#)
102. Nithipatikom, K., Isbell, M. A., Endsley, M. P., Woodliff, J. E., Campbell, W. B. (2011). Anti-proliferative effect of a putative endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol ether in prostate carcinoma cells. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 94(1-2), 34-43. [\[CrossRef\]](#)
103. DeMorrow, S., Francis, H., Gaudio, E., Venter, J., Franchitto, A., Kopriva, S., Alpini, G. (2008). The endocannabinoid anandamide inhibits cholangiocarcinoma growth via activation of the noncanonical Wnt signaling pathway. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 295(6), G1150-G1158. [\[CrossRef\]](#)
104. Frampton, G., Coufal, M., Li, H., Ramirez, J., DeMorrow, S. (2010). Opposing actions of endocannabinoids on cholangiocarcinoma growth is via the differential activation of Notch signaling. *Experimental cell research*, 316(9), 1465-1478. [\[CrossRef\]](#)
105. Ramer, R., Schwarz, R., Hinz, B. (2019). Modulation of the Endocannabinoid System as a Potential Anticancer Strategy. *Frontiers in pharmacology*, 10, 430-430. [\[CrossRef\]](#)
106. Vara, D., Salazar, M., Olea-Herrero, N., Guzmán, M., Velasco, G., Díaz-Laviada, I. (2011). Anti-tumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma: role of AMPK-dependent activation of autophagy. *Cell Death Differ*, 18(7), 1099-1111. [\[CrossRef\]](#)
107. Xu, D., Wang, J., Zhou, Z., He, Z., Zhao, Q. (2015). Cannabinoid WIN55, 212-2 induces cell cycle arrest and inhibits the proliferation and migration of human BEL7402 hepatocellular carcinoma cells Corrigendum in /mmr/13/1/1054. *Mol Med Rep*, 12(6), 7963-7970. [\[CrossRef\]](#)
108. Sallan, S. E., Zinberg, N. E., Frei, E., 3rd. (1975). Antiemetic effect of delta-9-tetrahydrocannabinol in patients receiving cancer chemotherapy. *N Engl J Med*, 293(16), 795-797. [\[CrossRef\]](#)
109. Darmani, N. A. (2001b). Delta(9)-tetrahydrocannabinol and synthetic cannabinoids prevent emesis produced by the cannabinoid CB(1) receptor antagonist/inverse agonist SR 141716A. *Neuropsychopharmacology*, 24(2), 198-203. [\[CrossRef\]](#)
110. Darmani, N. A. (2001a). Delta-9-tetrahydrocannabinol differentially suppresses cisplatin-induced emesis and indices of motor function via cannabinoid CB(1) receptors in the least shrew. *Pharmacol Biochem Behav*, 69(1-2), 239-249. [\[CrossRef\]](#)
111. Pomeroy, M., Fennelly, J. J., Towers, M. (1986). Prospective randomized double-blind trial of nabilone versus domperidone in the treatment of cytotoxic-induced emesis. *Cancer Chemother Pharmacol*, 17(3), 285-288. [\[CrossRef\]](#)
112. Meiri, E., Jhangiani, H., Vredenburgh, J. J., Barbato, L. M., Carter, F. J., Yang, H. M., Baranowski, V. (2007). Efficacy of dronabinol alone and in combination with ondansetron versus ondansetron alone for delayed chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Curr Med Res Opin*, 23(3), 533-543. [\[CrossRef\]](#)

113. Polito, S., MacDonald, T., Romanick, M., Jupp, J., Wiernikowski, J., Vennettilli, A., Dupuis, L. L. (2018). Safety and efficacy of nabilone for acute chemotherapy-induced vomiting prophylaxis in pediatric patients: A multicenter, retrospective review. *Pediatr Blood Cancer*, 65(12), e27374. [\[CrossRef\]](#)
114. Kleine-Brueggeney, M., Greif, R., Brenneisen, R., Urwyler, N., Stueber, F., Theiler, L. G. (2015). Intravenous Delta-9-Tetrahydrocannabinol to Prevent Postoperative Nausea and Vomiting: A Randomized Controlled Trial. *Anesth Analg*, 121(5), 1157-1164. [\[CrossRef\]](#)
115. Pellati, F., Borgonetti, V., Brighenti, V., Biagi, M., Benvenuti, S., Corsi, L. (2018). *Cannabis sativa* L. and Nonpsychoactive Cannabinoids: Their Chemistry and Role against Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer. *BioMed research international*, 2018, 1691428. [\[CrossRef\]](#)
116. Costa, B., Colleoni, M., Conti, S., Parolaro, D., Franke, C., Trovato, A. E., Giagnoni, G. (2004). Oral anti-inflammatory activity of cannabidiol, a non-psychoactive constituent of cannabis, in acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 369(3), 294–299. [\[CrossRef\]](#)
117. Petrosino, S., Verde, R., Vaia, M., Allarà, M., Iuvone, T., Di Marzo, V. (2018). Anti-inflammatory Properties of Cannabidiol, a Nonpsychotropic Cannabinoid, in Experimental Allergic Contact Dermatitis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 365(3), 652–663. [\[CrossRef\]](#)
118. Mackie, K., Stella, N. (2006). Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *The AAPS journal*, 8(2), E298–E306. [\[CrossRef\]](#)
119. Parlakpınar, Hakan Celbis, Osman Ozhan, Onural Petekkaya, Semih Samdanci, Emine Ermis, Necip Koparir, Pelin Soylu, Ozcan Acet, Ahmet. (2016). Cardiovascular effects of JWH-018 from synthetic cannabinoids [Sentetik kannabinoidlerden JWH-018'in kardiyovaskuler etkileri], *Medicine Science*, 5. 1. [\[CrossRef\]](#)
120. Köksoy S, Başalp A. (2021). Effect of synthetic cannabinoids (JWH-018) on antibody response to HBV vaccination, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2021; 9(1): 21-26. [\[CrossRef\]](#)
121. Kogan, N. M., Mechoulam, R. (2007). Cannabinoids in health and disease. *Dialogues in clinical neuroscience*, 9(4), 413–430. [\[CrossRef\]](#)
122. Wong, K. U., Baum, C. R. (2019). Acute Cannabis Toxicity. *Pediatric emergency care*, 35(11), 799–804. [\[CrossRef\]](#)
123. Kuzucuoğlu, T., Uçkun, S., Temizel, F., Arslan, G., Çevik, B. (2018). Kannabinoid İntoksikasyonlarının Yoğun Bakım Sonuçları: Olgu Serisi. *Dahili ve Cerrahi Bilimler Yoğun Bakım Dergisi*.; 9(3): 84 - 87. [\[CrossRef\]](#)

RESVERATROLÜN BULUNDUĞU KAYNAKLAR VE TIBBİ ÖNEMİ

SOURCES OF RESVERATROL AND ITS MEDICINAL SIGNIFICANCE

Seren GÜNDOĞDU¹, Ümmügülsüm UÇAR², Ayşe KURUÜZÜM-UZ^{1,*}

¹Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi AbD., 06100 Ankara, Türkiye

²Gülsüm Eczanesi, Öğretmenler Mah. 2901. Sok. no: 19/A Tarsus/Mersin, Türkiye

ÖZ

Amaç: Resveratrol (*trans-3,5,4'-trihidroksi-stilben*) üzüm, asma, yer fıstığı, kızılcık, yaban mersini gibi birçok bitkisel kaynaktan bulunan polifenolik bir bileşiktir. Resveratrol ile ilgili daha önceki araştırmalar kardiyovasküler sistemler, inflamasyon ve karsinogenez/kanser gelişimi ile ilgili farmakolojik etkileri üzerine odaklıyken son zamanlarda araştırmaların büyük çoğunluğu yaşlanma süreci, diyabet, alzheimer ve diğer nörodejeneratif hastalıklar üzerinde potansiyel etkileri keşfedilerek genişletilmiştir. Bu derleme kapsamında resveratrol hakkında genel bilgilerin, bulunduğu kaynakların ve özellikle son yıllarda üzerinde çalışılan biyolojik etkilerinin (*in vitro*, *in vivo*) derlenmesi amaçlanmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Resveratrolün yapısal olarak *trans-* formu baskındır. Bitkilerde daha stabil ve oksidatif bozunmaya karşı dayanıklı olan glikozitleri halinde bulunmaktadır. Resveratrol eldesinde sıklıkla kullanılan *Polygonum cuspidatum* bitkisinin çeşitli ekstreleri, ticari önemi olan ürünlerin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Resveratrol başlıca antiinflamatuvar, antioksidan, antikanser ve kardiyoprotektif etkilere sahip bir moleküldür. Yapılan farmakokinetik çalışmalarda resveratrolün iyi absorbe edildiği, ilk geçiş etkisi nedeniyle sülfat ve glukuronit konjugatları şeklinde hızla metabolize edildiği ve idrarla elimine edildiği bildirilmiştir. Ayrıca resveratrolün iyi tolere edildiği ve belirgin bir toksisite göstermediği rapor edilmiştir. Gıda/nutrasötik veya ilaç şeklinde alınabilen resveratrolün insan sağlığı üzerine olan çeşitli etkilerinden faydalanmak amacıyla biyoyararlanımı göz önüne alındığında iyi formüle edilmiş resveratrol taşıyan tablet, kapsül, nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması ve kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, kardiyoprotektif, nöroprotektif, resveratrol, tıbbi bitki

ABSTRACT

Objective: Resveratrol (*trans-3,5,4'-trihydroxy-stilbene*) is a polyphenolic compound found in many plant sources such as grapes, vine, peanuts, cranberries, blueberries. While previous research on resveratrol has focused on its pharmacological effects on cardiovascular systems, inflammation, and carcinogenesis/cancer development, most of the research has recently been expanded by exploring its potential effects on the aging process, diabetes, Alzheimer's, and other neurodegenerative diseases. Within the scope of this review, it is aimed

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Ayşe Kuruüzüm Uz
e-posta / e-mail: ayseuz@hacettepe.edu.tr, Tel. / Phone: 03123051089

to compile general information about resveratrol, its sources, and especially its biological effects (in vitro, in vivo) studied in recent years.

Result and Discussion: Resveratrol is structurally dominated by the trans- form. It is found in plants as glycosides that are more stable and resistant to oxidative degradation. Various extracts of the *Polygonum cuspidatum* plant, which are frequently used in the production of resveratrol, have led to the emergence of commercially important products. Resveratrol is a molecule that has mainly anti-inflammatory, antioxidant, anticancer, and cardioprotective effects. In pharmacokinetic studies, it has been reported that resveratrol is well absorbed, rapidly metabolized in the form of sulfate and glucuronide conjugates due to its first-pass effect, and eliminated in the urine. Besides, resveratrol has been reported to be well-tolerated and to show no apparent toxicity. Considering the bioavailability of resveratrol, which can be taken as food/nutraceutical or as a medicine, to benefit from the various effects on human health, it was concluded that tablet, capsule, and nanoparticle formulations containing well-formulated resveratrol should be prepared and used.

Keywords: Antioxidant, cardioprotective, medicinal plant, neuroprotective, resveratrol

GİRİŞ

Fenolik madde gruplarından birisi olan stilbenler, buldukları bitkide fitoaleksinin olarak da görev yapan moleküllerdir. Fitoaleksinler, stres kökenli faktörlere karşı yanıt olarak sentezlenen düşük moleküler ağırlıklı sekonder metabolit gruplarıdır [1, 2]. Resveratrol (*trans-3,5,4'-trihidroksi-stilben*), 1940 yılında Takaoka tarafından *Veratrum grandiflorum* köklerinden ilk kez izole edilmiştir, daha sonra bu amaçla *Polygonum cuspidatum* kökleri kullanılmıştır [3]. Geleneksel Japon ve Çin tıbbında halk ilacı olarak kullanılan, “kojo-kon” adlı ilaç *Polygonum cuspidatum* köklerini içermekte ve damar tıkanıklığı, hipertansiyon, alerji ve cilt iltihabı gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır [4]. Resveratrol adının, izolasyonunda kullanılan bitki kaynağı ve kimyasal yapısındaki hidroksil(-OH) grupları(-ol) kombinasyonundan ileri geldiği düşünülmektedir [5]. Resveratrol, 34 familyaya ait 100 bitki türünde bulunmuştur. Resveratrol içerdiği tespit edilen familyalardan; Vitaceae, Moraceae, Dipterocarpaceae, Myrtaceae, Fagaceae, Cyperaceae, Fabaceae, Pinaceae ve Liliaceae spermatofitler bölümüne aittir [6, 7].

Resveratrol doğada üzüm, yer fıstığı, asma, dut, yaban mersini, kızılıçık gibi birçok kaynaktan bulunan bir polifenolik antioksidandır. Bulduğu başlıca besin kaynakları arasında: üzüm (*Vitis vinifera*), dut (*Morus rubra*), yer fıstığı (*Arachis hypogaea*) ve uzun zamandır Japonya ve Çin'de kalp hastalığı ve inme için geleneksel bir bitkisel ilaç olarak kullanılan Japanese knotweed/Itadori çayı yaygın adlarıyla bilinen Japon madımağı (*Polygonum cuspidatum*) vardır [8, 9].

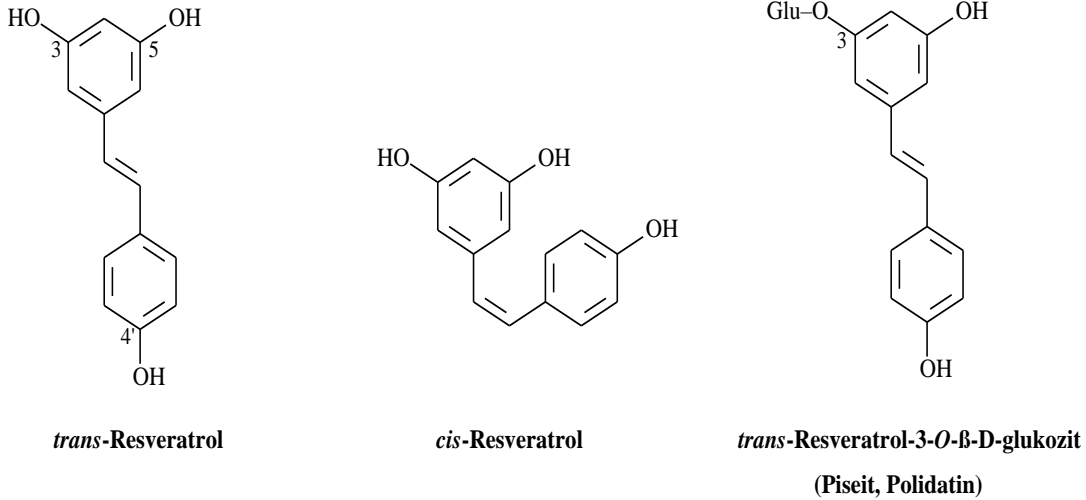
Resveratrol biyosentezinde ana enzim, bir *p*-kumaroil-KoA (4-kumaroil-KoA) ve üç malonil-CoA molekülünü yoğunlaştıran stilben sentazdır [10, 11]. Resveratrolün doğada, *trans*- ve *cis*- izomerleri vardır, çoğunlukla *trans*- formda bulunmaktadır [12, 13]. Bu durumun şaraplarda farklılık göstermesi ve *cis*- izomerin yüksek miktarlarda bulunması dikkat çeken bir durumdur [14, 15]. Şaraplarda görülen bu farklılığın, yapımı esnasında *trans*-resveratrolün izomerizasyonundan kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir [16].

Resveratrol; antioksidatif, antiinflamatuvar, antitümör, antiviral, antidiyabet, kardiyoprotektif, göz hastalıklarına karşı koruyucu, fitoöstrojen ve yaşam uzatıcı özellikleri nedeniyle birçok yönden tıbbi değeri olan, yaygın olarak incelenen fitokimyasallardan biridir [9, 17-21]. Özellikle koroner kalp hastalıkları üzerinde koruyucu etkisi olduğu ve Fransız toplumunda yağ/kolesterol bakımından zengin besinlerin sıklıkla tüketilmesine rağmen koroner kalp hastalıklarına bağlı ölümlerin az görülmesinde, orta düzeyde şarap tüketimiyle resveratrol alımının etkisi olduğu düşünülmektedir (Fransız paradoksu) [22]. Son yıllarda resveratrol ile ilgili araştırmaların büyük çoğunluğu kanserde farklı yollarda gösterdiği etkiler üzerine yoğunlaşmıştır.

Bu çalışmada; resveratrol hakkında genel bilgiler verilmiş, tıbbi önemi ve bu alanda umut vadeden çalışmalar üzerinde durulmuştur.

Kimyasal Yapı

Resveratrol(*trans*-3,5,4'-trihidroksi-stilben;5-[(1E)-2-(4-Hidroksifenil)etenil]-1,3-benzenediol) etilen köprüsü ile bağlı iki aromatik halka ve üç hidroksil grubu içermektedir [23, 24]. Resveratrolün hem *cis*- hem de *trans*- izomerlerinin glikozit formları mevcuttur. Resveratrolün majör formu olarak bilinen glikozit *trans*-resveratrol-3-*O*- β -D glikozittir ve "piseit veya polidatin" olarak da adlandırılmaktadır (Şekil 1) [23, 25].



Şekil 1. *Trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol ve piseit formülü [26]

Resveratrolün dimer, trimer ve tetramer yapısındaki farklı stilben bileşikleri bulunmaktadır. Üzümdeki majör oligomer ϵ -viniferin, resveratrol dehidrodimeridir. Asmada ϵ -viniferinden türetilen dimerler (ampelopsin B, D ve F ve palidol), trimerler (α -viniferin) ve tetramerler (β -viniferin ve umutafenoller) dahil olmak üzere çeşitli resveratrol oligomerleri tanımlanmıştır [27].

Resveratrolün *trans*- ve *cis*- formlarının aglikon ve glikozit konsantrasyonlarının birçok değişkene (mantar, UV radyasyon, kimyasal etkenler) bağlı olduğu gösterilmiştir [28]. Farmakokinetik

çalışmalarda resveratrolün ağız yoluyla alındıktan hemen sonra sindirildiği ve özellikle glukuronit konjugatı halinde hızla kana karıştığı bildirilmiştir. Ayrıca resveratrolün glikozillenmiş formunun daha stabil ve oksidatif bozunmaya karşı daha dayanıklı olduğu, insan gastrointestinal sisteminden absorbe olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur [29, 30]. Chukwumah ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; haşlanmış ve kavrulmuş yer fıstığının *in vitro* sindirilmesi ile hazırlanan misellerindeki *trans*-resveratrolün insan kolon epitelyal hücresi Caco-2'deki absorpsiyonu ölçülmüştür. Çalışmanın sonucunda kavrulmuş yer fıstığından elde edilen resveratrolün haşlanmış yer fıstığındaki resveratrol'den daha iyi absorbe edildiği gözlemiştir [31]. Resveratrolün antioksidan özelliği, hidroksil gruplarının stilben iskeleti üzerinde konumlandırılmış olmasından kaynaklanır. Resveratrol türevli dimerler rezorsinol yapısına sahiptir ve antioksidan, nöroprotektif, anti-HIV [32], anti-tirozinaz ve sitotoksik aktivite gösteren oksidatif bağlanma ile oluşurlar [33].

Resveratrolün Farmakokinetiği ve Toksisitesi

Resveratrolün farmakokinetiğine dair yapılan *in vitro/in vivo* çalışmalarda; uygulanan doz ile birlikte dozaj formunun, uygulama yolunun ve diyetin resveratrol absorpsiyonunu etkilediği gösterilmiştir. Resveratrol, oral uygulamayı takiben gastrointestinal sistem tarafından hızla absorbe edilir ve maksimum plazma konsantrasyonuna (C_{max}) yüksek doz ve düşük dozda sırasıyla 30 dk ve 1,5-2 saat içerisinde ulaşmaktadır [34]. Resveratrolün *ex vivo* perkütan absorpsiyonunun ölçüldüğu bir çalışmada, 20 mg resveratrol içeren, sürekli salım sağlayan emülsiyon formda kremin uygulanması ile 24 saatin sonunda 12,53 mg resveratrolün plazmaya geçtiği gözlenmiştir [35]. Resveratrolün dağılımı tam olarak karakterize edilememiş olsa da yapılan *in vivo* çalışmalarda daha çok karaciğer, beyin, bağırsak ve adipoz dokularda yoğunlaştığı bildirilmiştir [36]. Resveratrolün metabolizasyonu ile ilgili genel görüş; oral uygulama sonrasında enterositlerin ve hepatositlerin başlıca metabolize edici hücreler olduğu yönündedir. Resveratrolün bu hücrelerde ilk geçiş etkisine uğrayarak glukuronidasyona uğradığı bilinmektedir [37]. Resveratrolün biyotransformasyonunda Faz II metabolik enzimlerin ve bağırsak mikrobiyotasının kritik öneme sahip olduğu belirtilmektedir. Özellikle UDP-glukuronoziltransferaz (UGT) ailesi, resveratrol metabolizmasında etkin rol almaktadır. Resveratrol-3-*O*-glukuronit ve resveratrol-*O*-glukuronit, resveratrolün ana glukuronitleri olarak; resveratrol-3-*O*-sülfat, resveratrol-*O*-sülfat ve resveratrol-3-*O*-disülfat ise resveratrolün ana sülfatları olarak rapor edilmiştir [38]. Resveratrol ve metabolitleri esas olarak idrarla elimine edilirler. Özellikle resveratrol formunun eliminasyonu etkilediği, mikro partikül ve nanokapsül formuna getirilmiş resveratrolün standart formdan daha yavaş elimine edildiği bildirilmiştir [34]. Crowell ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde yaptığı toksisite çalışmasında; 0,3, 1 ve 3 g/kg/gün *trans*-resveratrol 4 hafta boyunca uygulanmıştır (bu miktarlar sırasıyla 70 kg'lık insanda 21, 70, ve 210 g/gün *trans*-resveratrol uygulanmasına tekabül etmektedir.). En yüksek doz alan 40 sıçandan yalnızca ikisi resveratrol tedavisine bağlı olarak ölmüştür. Yan etkilerin çoğu yüksek doz kaynaklı ve nefrotoksisiteye bağlı olarak görülmüştür. Resveratrolün 0,3 g/kg/gün

olarak uygulandığı hayvanların karaciğerinde herhangi bir histolojik değişiklik görülmemiştir [39]. Williams ve arkadaşları tarafından *in vivo* olarak resveratrolün düşük ve 750 mg/kg/gün'e kadar yüksek dozları fare ve tavşanlar üzerine 3 ay boyunca uygulanmıştır. Çalışmalar sonucunda araştırmacılar tarafından, resveratrolün iyi tolere edildiği ve toksik etki göstermediği, erkek ya da dişilerin üreme kapasitesi ve embriyofetal özellikler üzerinde toksik etki göstermediği saptanmıştır [40].

Resveratrol İçeren Bitkisel Kaynaklar

Resveratrolün içinde bulunduğu kaynaklar arasında üzüm, asma, yer fıstığı, yaban mersini, böğürtlen, çilek, antep fıstığı, kızılılık ve mor üzüm suyu gibi önemli sayıda besinlerin başta geldiği bildirilmiştir [7, 23]. Asma diğer bitki türleri ile karşılaştırıldığında; yüksek resveratrol kapasitesi ve taze veya işlenmiş ürünlerinin (şarap, sirke, kuru üzüm, pekmez vb.) yaygın tüketimi nedeni ile önem kazanmaktadır. Resveratrolün, özellikle renkli üzüm çeşitlerinin kabuklarında yüksek miktarda bulunduğu kayıtlıdır (0,30-14,10 mg/g *yaş*; 9,30-78,50 mg/g *kuru* ağırlık) [41]. Üzüm içeriğindeki resveratrol miktarının, üzümün çeşidine ve coğrafik kökenine bağlı olarak farklılık gösterdiği, mantar enfeksiyonu ve UV radyasyona maruz kalma durumlarında arttığı bilinmektedir. Kırmızı şarap içerisindeki resveratrolün majör formu olan *trans*- izomerin konsantrasyonu 0,1-15 mg/L arasında değişmektedir [28]. Fıstıkta bulunan resveratrol içeriği şarap ile karşılaştırıldığında fıstığın şarapta bulunan miktarın yarısı kadar resveratrol içerdiği bulunmuştur. Böğürtlenin resveratrol içeriği yaban mersiniyle karşılaştırıldığında ise böğürtlenin yaban mersininde bulunan miktarın iki katı resveratrol içerdiği gösterilmiştir. Isının kararlı olmadığı durumlarda, pişirme ya da diğer termal uygulamalar resveratrol içeren meyveler üzerine uygulandığında resveratrol içeriklerinin azaldığı görülmüştür [29]. Amerika'da en çok satılan 19 farklı çikolata çeşidinin *trans*-resveratrol içeriğini tayin eden Hurst ve arkadaşları, kakao içeren ürünlerin ve çikolata ürünlerinin diyetle en yüksek toplam *trans*-resveratrol seviyesine sahip olan gıdalarda kırmızı şaraplar ve üzüm suyundan sonra ikinci sırada yer alacağını belirtmişlerdir [42]. Resveratrol içeren başlıca besin, bitki kaynakları ve *trans*-resveratrol düzeyleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1'de yer alan bitkilerin yanı sıra *Archontophoenix alexandrae*, *Bauhinia racemosa*, *Belamcanda chinensis*, *Exbucklandia populnea*, *Fallopia multiflora*, *Gnetum parvifolium*, *Rumex japonicus*, *Smilax* sp., *Syzygium jambos* ve *Veratrum nigrum* türlerinin de düşük konsantrasyonlarda resveratrol içerdiği bildirilmiştir [7].

Resveratrolün Tıbbi Önemi

Günümüzde resveratrole olan ilgi büyük oranda artmıştır. Resveratrolün birçok hastalığın temelinde rol oynayan antioksidan ve antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Kanser, kalp hastalıkları, diyabet, obezite ve yaşlanmaya bağlı göz hastalıkları gibi kronik hastalıkların profilaksisinde/tedavisindeki potansiyel önemi *in vitro* ve *in vivo* olarak kanıtlamıştır [23, 63-65]. Yapılan metabolizma çalışmalarında iyi absorbe edildiği ve ilk geçiş etkisi nedeniyle hızla metabolize

olduğu bildirilmiştir [29]. Ayrıca resveratrolün iyi tolere edildiği ve belirgin bir toksik etkisinin olmadığı rapor edilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalara bakıldığında özellikle resveratrolün kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisi dikkat çekmektedir.

Tablo 1. Resveratrol içeren kaynaklar

Latince Bitki Adı- Familya/Türkçe Adı	Trans-Resveratrol Konsantrasyonu		Kaynak
	µg/g		
<i>Polygonum cuspidatum</i> Polygonaceae (Japon madımağı)	523,0 68,0 µg/mL (Itadori çayı)		[9]
<i>Morus rubra</i> Moraceae (Dut)	50,61 (kuru ağırlık)		[43]
<i>Arachis hypogaea</i> Fabaceae (Yer fıstığı)	5,10 (haşlanmış); 0,01-1,92 (taze) 0,27-0,75 (ezmesi); 0,06 (kavrulmuş)		[9, 44-46]
<i>Vitis vinifera</i> Vitaceae (Üzüm)	0,16-3,54 1,35-15,47 mg/kg (siyah üzüm kabuğu)		[9, 47, 48]
<i>Phoenix dactylifera</i> Arecaceae (Hurma)	3,0		[49]
<i>Solanum lycopersicum</i> Solanaceae (Domates)	0,2-2,1		[49]
<i>Pistacia vera</i> Anacardiaceae (Antep fıstığı)	0,09-1,67		[46]
<i>Vaccinium myrtillus</i> Ericaceae (Yaban mersini)	0,8 0,93 nmol/g (taze suyu)		[50-52]
<i>Fragaria L.</i> Rosaceae (Çilek)	0,2		[49]
<i>Paeonia sp.</i> Ranunculaceae (Şakayık)	0,02-0,87		[7]
<i>Ananas comosus</i> Bromeliaceae (Ananas)	0,01		[7]
	mg/kg		
<i>Humulus lupulus</i> Cannabaceae (Şerbetçi otu)	0,5-1,0		[53, 54]
Bitter çikolata	0,4		[55]
	mg/L		
Kırmızı şarap	0,10-14,32		[56-59]
Beyaz şarap	0,03-2,58		[57, 59, 60]
Kırmızı üzüm suyu	0,09-1,09		[25, 61,62]
Beyaz üzüm suyu	0,03-0,19		[25]

Antioksidan Etki

Resveratrolün antioksidan rolü üç farklı mekanizma ile açıklanmıştır: koenzim Q ile yarışma ve reaktif oksijen türleri (ROS) oluşum yerinde oksidatif zincir kompleksini azaltması, mitokondride oluşan süperoksit radikalini yakalama ve fenton reaksiyon ürünleri ile indüklenen lipid

peroksidasyonunun inhibisyonu. Birçok çalışmada resveratrolün hem süperoksit hem de hidroksil radikali yakalama kapasitesinin olduğu belirtilmiştir [66]. Resveratrolün hidroksil, süperoksit, metal/enzimatik kökenli ve hücrel olarak üretilen radikalleri içeren çeşitli sistemler üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; bu radikaller üzerinde oldukça etkili olması yanında ROS üreten hücrelerde antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmanın sonucunda; resveratrolün, hücre zarında meydana gelen lipid peroksidasyonuna ve ROS'un yol açtığı DNA hasarına karşı koruyucu bir etkinliğe sahip olduğu ayrıca hücrelerin metal kökenli radikallere maruziyetinden sonra nükleer faktör kappa B (NF-κB) sinyal yolu üzerinde inhibitör etki sergilediği sonucuna varılmıştır [67]. Vücudumuzdaki prooksidan-antioksidan dengesi, sağlıklı bir yaşam sürdürebilmemiz adına büyük önem taşımaktadır. Organizmadaki serbest radikallerin meydana gelişindeki artış ve/veya antioksidan sistemdeki bozukluklar sonucu oksidatif stres gelişmektedir [68]. Resveratrolün pro-oksidatif genleri (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz ve miyeloperoksidaz gibi) baskılayarak ve süperoksit dismutaz (SOD), tiyoredoksin redüktaz, glutasyon peroksidaz (GSH-Px), hem oksijenaz ve katalaz dahil olmak üzere antioksidan enzimleri ya da substratlarını indükleyerek ROS oluşumunu inhibe ettiğini gösteren birçok çalışma mevcuttur. Ek olarak artan yağda çözünürlüğün absorpsiyonu attırdığı çalışmalar göz önüne alınarak, resveratrol, tirozol ve bunların asetillenmiş türevlerinin *in vitro* antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Kimyasal olarak sentezlenen asetillenmiş türevler, DPPH radikallerini temizleme, enzimatik olmayan linoleik asit peroksidasyonunu inhibe etme, bakır iyonları varlığında insan serum oksidasyonunu inhibe etme ve lipoksijenaz aktivitesini inhibe etme yetenekleri bakımından değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda; resveratrolün tirozolden daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği, asetilasyon ile artan lipofilikliğin, enzimatik olmayan lipid peroksidasyon deneylerinde fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir [69].

Antienflamatuvar Etki

Resveratrolün uzun dönemde mide hasarı oluşturabilen aspirin yerine kronik enflamasyonun geçerli tedavilerinde kullanılabilecek bir alternatif olabileceği belirtilmiştir [26]. Cui ve arkadaşları tarafından yapılan bir deneyde resveratrolün, dekstran sülfat sodyum (DSS) fare kolit modelinde indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS), siklooksijenaz-2 (COX-2) ve tümör nekroz faktörü-α (TNF-α) gibi enflamasyon belirteçlerini önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir [18, 70]. DSS ile indüklenen kolit modeli kullanılarak yapılan benzer bir çalışmada da resveratrol desteğinin interlökin-1 beta (IL-1b), IL-10, prostaglandin E sentazları-1 (PGES-1), TNF-α, iNOS ve COX-2, p38 MAPK (mitojenle aktifleştirilen protein kinazlar) sinyal yolunun aşağı regülasyonu yoluyla kronik kolon enflamasyonunu azalttığı tespit edilmiştir [63]. Ayrıca Lee ve arkadaşlarının yaptığı bir *in vitro* çalışmada, güçlü antienflamatuvar aktiviteye sahip biyoaktif bir flavonoid olan apigeninin (50 mg/kg) ile resveratrolün (25 mg/kg) aynı anda uygulanmasının, farelerde karragenan kaynaklı enflamasyonun neden olduğu pençe ödemi %23,81-61,20 oranında azalttığı ve apigeninin plazma konsantrasyonunda önemli bir

artış gözlemlendiği ($452,996 \pm 155,857$ ng/mL'den $1084,600 \pm 243,508$ ng/mL'ye) bildirilmiştir. Bu bulgular resveratrolün, apigeninin antiinflamatuvar aktivitesini güçlendirmede sinerjistik etki sağlayabileceğini göstermiştir [71].

Ateroprotektif ve Kardiyoprotektif Etki

Resveratrolün ateroprotektif ve kardiyoprotektif etkisi ile ilgili çok fazla *in vivo* ve *in vitro* bilimsel araştırma bulunmaktadır. *In vivo* çalışmalarda resveratrolün izole sıçan kalplerinde iskemi/reperfüzyon'a karşı koruyucu olduğu kanıtlanmıştır. İskemik sonuçların alınmasından önce organın $10 \mu\text{M}$ resveratrol ile 10-15 dk perfüzyona uğratılması ile kan basıncının ve aortik akışın düzenlendiği, malondialdehit konsantrasyonunun ve enfarkt boyutunun azaltıldığı gösterilmiştir [72]. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda resveratrol bakımından zengin Akdeniz diyetinin, kardiyovasküler hastalık riskini belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir. Resveratrolün nitrik oksit (NO) modülasyonu, vazodilatasyona ve endotelial disfonksiyonda azalmaya yol açtığı bulunmuştur. Resveratrol tarafından kardiyoprotektif etki mekanizmaları 5'-adenozin monofosfat-aktive edilmiş protein kinaz- aracılı NO artışı, tetrahidrobiopterin seviyesinde artışla endotelial NO sentez artışı ve vasküler oksidatif strese azalma şeklinde gösterilmiştir [73].

Kolesterol ve Trigliserid Seviyeleri Üzerine Etki

Yapılan bir *in vivo* çalışmada, hiperlipidemi geliştirmek üzere subkütan enjeksiyonla AH109A sıçan asit hepotoma hücre hattı yerleştirilmiş olan Donryu sıçanlarına 20 gün boyunca oral yoldan 10-50 ppm resveratrol verilmiştir. Resveratrolün, AH109A hücre hattında proliferasyonu ve metastazı engellediği bildirilmiştir. Ayrıca resveratrolün doza bağımlı olarak serum trigliserit, çok düşük dansiteli lipoprotein ile düşük dansiteli lipoprotein (VLDL+LDL), kolesterol seviyelerini baskıladığı gözlemlenmiştir. Çalışmanın sonucunda resveratrolün hipokolesterolemik etkisi, kısmen nötral sterollerin ve safra asitlerinin dışkıya boşalmasını azaltmasına bağlanmıştır [74]. Resveratrolün, total kolesterol ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerde bulunan kolesterolü (LDL-C) düşürmede kısmen sorumlu olduğu ve ateroskleroz gelişim mekanizmasından sorumlu tutulan LDL oksidasyonunu (bu bileşiğin antioksidan özelliği sayesinde) engellediği konusunda pek çok çalışma vardır [41]. Wang ve arkadaşlarının yüksek kolesterollü (%1,5) diyetle beslenen tavşanlarda yaptığı *in vivo* bir çalışmada, resveratrolün (3 mg/kg/gün) aterosklerotik plakların oluşumunu azalttığı ve akış aracılı dilatasyonu restore ettiği gösterilmiştir [75].

Kanser Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etki

Resveratrolün, hücre döngüsünün durdurulmasını ve apoptoz aracılı hücre ölümünü indükleyerek karsinogenezisin üç ana basamağı olan; başlangıç, çoğalma ve metastaz ile ilişkili hücresel olayları inhibe ettiği bilinmektedir [78]. *In vitro* ortamda çeşitli kanser hücreleri üzerinde büyümeyi

inhibe edici etkisi gösterilmiştir. Bunlar arasında kolon [77], prostat [78, 79] meme [80], lenfoma ve lösemi [81] kanser hücreleri bulunmaktadır [82].

İmmün Sistem Üzerine Etki

Tip I diyabet, aktive edilmiş T lenfositlerin ve monositlerin pankreastaki Langerhans adacıklarına infiltrasyonu ile karakterizedir ve insülin üreten β hücrelerinin iltihaplanması ve akabinde yıkımı ile sonuçlanır. Non-obezy diyabetik farelerin izlendiği bir çalışmada; diyet sonrası kontrol grubu %71 diyabetli seyrederken, diyabet insidansının %1'lik liyofilize üzüm tozu ile beslenen farelerde %33'e indirildiği ve bu farelerden alınan splenositlerin (dalak sinuslarında yerleşik mononükleer makrofaj hücrelerin), lipopolisakkarit (LPS) stimülasyonundan sonra nispeten daha düşük TNF- α üretimine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu araştırmanın sonucuna göre resveratrolün, otoimmün diyabetin başlangıcını ve patogenezi azaltmada potansiyel etkili olduğu düşünülmüştür [70]. Araştırmacıların resveratrol ve türevleri üzerine yönelen ilgisi bu moleküllerin yer aldığı çok sayıda patenti de beraberinde getirmiştir. Bu patentlerin arasında, hücreSEL bağışıklık hücrelerinin doza bağlı olarak (düşük dozlarda immün sistemi uyarıcı etki ve daha yüksek dozlarda immünosupresif etki) resveratrol ve türevleri ile modüle edilebileceğine işaret eden bilgiler yer almaktadır. Bu çalışmalar umut vermekle birlikte, fitokimyasalların otoimmün bozukluklarda kullanılabilmesi konusunda ileri araştırmalara ihtiyaç vardır [83].

Antiviral Etki

Resveratrol üzerinde *in vitro* ve *in vivo* antiviral aktivite çalışmaların yapıldığı önemli bir polifenolik bileşiktir. Antiviral etkileri; viral replikasyon, protein sentezi, gen ekspresyonu ve nükleik asit sentezinin inhibisyonları ile ilişkilidir. İnfluenza virüsü enfeksiyonunda, resveratrolün MDCK hücrelerinde viral ribonükleoproteinlerin nükleer-sitoplazmik translokasyonunu aktif olarak bloke ettiği, böylece protein kinaz C ile ilişkili yolların inhibisyonu ile ilgili geç viral proteinlerin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir [84].

Resveratrol'ün MERS ile enfekte Vero E6 hücrelerinde, MERS-CoV enfeksiyonunu ve enfeksiyondan sonraki uzun süreli hücreSEL hayatta kalmayı önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilen bir çalışmada resveratrol tedavisinden sonra MERS-CoV replikasyonu için gerekli olan nükleokapsid (N) proteinin ekspresyonunu da azalttığı gözlenmiştir [20].

Antidiyabetik Etki

Resveratrolün diyabet üzerindeki etkileri genel olarak kan şekerini düşürmesine ve pankreastaki insülin salınımının gerçekleştiği beta (β) hücrelerini korumasına atfedilmektedir [85]. Do ve arkadaşları, resveratrol (% 0,02 w/w) ile beslenen C57BL/KsJ-db/db fareleri kullanılarak 6 haftalık bir çalışma yapmıştır ve resveratrol ile tedavinin, antidiyabetik bir ilaç olan rosiglitazon benzeri bir hipoglisemik etki göstererek açlık kan şekerini ve hemoglobin A1c (HbA1c)'yi önemli ölçüde azalttığını

gözlemlemişlerdir. Ayrıca resveratrolün, hepatik glikolitik gen ekspresyonunu, fosfoenolpiruvat karboksikinazı (PEPCK) ve glukoz 6-fosfat (G6P) ekspresyonunu etkili bir şekilde bastırđığını, piruvat kinazı (PK) ve karaciğerde glikojen sentezini azaltmaya yol açan, sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein 1c'yi (SREBP1c) artırdığını ifade etmişlerdir [86]. Resveratrolün düşük biyoyararlanımını iyileştirildiği ve pankreatik β TC hücre hattındaki antidiyabetik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; lipit bazlı, veziküler olmayan yeni ilaç taşıyıcı sistemlerinden nanokohleatlar kullanılmıştır. Bu çalışmadaki resveratrol yüklü nanokohleatlarla, streptozosin ile indüklenen diyabetik hücrelerde insülin sekresyonunun %85'e kadar çıktığı ve glukoz konsantrasyonun 317 mg/dL'den 207,7 mg/dL'ye düştüğü kaydedilmiştir [85]. Resveratrol ve kersetinin, diyabet ve komplikasyonları üzerine olan olumlu etkilerinden yola çıkılarak yapılan bir çalışmada ise: resveratrol (10 mg/kg) ve kersetin (30 mg/kg) kombinasyonunun, streptozotisin (50 mg/kg) ile indüklenmiş diyabetik Sprague-Dawley sıçanları üzerindeki antidiyabetik etkisi araştırılmıştır. Bu kombinasyonun diyabetik sıçanlarda hipoglisemik etki gösterdiği ve serum lipit (LDL ve VLDL gibi) seviyelerini düşürerek diyabetik komplikasyonlara bağlı gelişen dislipideminin kontrolünde faydalı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir [87].

Nöroprotektif Etki

Alzheimer Üzerine Etki

Resveratrolün akut nöroprotektif etkileri, birçok nörodejenerasyon modeli üzerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak tanımlanmıştır. Yapılan bir çalışmada, uzun dönem resveratrol diyet takviyesi uygulaması ile farelerin davranışları, nörokimyasal ve serebrovasküler seviyeleri üzerinde gözlem yapılarak, nöroprotektif etkisi incelenmiştir. Çalışmalarda resveratrolün, yaşlanan farelerin bilişsel fonksiyonlarını korumada etkili olduğu gösterilmiştir [88]. Astrositlerin (Glia hücresi), sinir sisteminde en fonksiyonel gruplardan biri olup glutamaterjik metabolizma, iletim, sinaptik plastisite ve nöron koruma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Resveratrolün özellikleri ve beyinsel değişikliklere yol açan önemli astroglial parametrelerindeki oksidatif hasara karşı oluşturduğu cevaplar üzerinde durulan bir çalışmada, bu cevaplara örnek olarak glutamat alımını, glutamin sentez aktivitesini ve glutatyon içeriğini etkilemesi gösterilmiştir. Resveratrolün astrositler ve etkileri üzerinden nöron koruyucu etkisinin olduğu düşünölmüş ve bununla birlikte Alzheimer, Parkinson gibi hastalıklarda da bu sayede etkili olabileceği düşünölmüştür [89]. Kültür ortamına uygulanan resveratrolün, nöronların tip ve çeşitliliğini strese bağlı ölümlerden koruduğu gösterilmiştir. Yine diyetle alınan resveratrolün farelerde akut ve kronik strese bağlı nöronal hasar ve ölümleri iyi yönde düzelttiği gösterilmiştir. Birçok deneysel veride resveratrolün oksidatif hasar oluşumunu azalttığı gösterilmiştir [90].

Amiloid plakların hücre dışı birikimi Alzheimer hastalığı gelişiminde erken patolojik lezyon olarak tanımlanmaktadır. Alzheimer hastalığı için resveratrolün yararlı etkileri, β amiloid plağının azaltılmasının yanı sıra mitokondriyal fonksiyonu iyileştirmesi, ROS aktivitesini artırması ve SIRT1 yolunu aktive ederek nöronal hücre sağ kalımını arttırması sonucu ortaya çıkmıştır [91].

Parkinson Üzerine Etki

Parkinson hastalığında oksidatif stresin dopaminerjik nöronların apoptik ölümüne yol açtığı bilinmektedir. Yapılan *in vitro* bir çalışmada; resveratrolün sıçan PC12 hücrelerinde mRNA seviyelerini, Bax ve Bcl-2 genlerinin protein ekspresyonunu modüle ettiği gözlenmiştir. Ayrıca resveratrolün kullanılmasıyla dopaminerjik nöronlar üzerinde oksidatif stres oluşturan Parkinson toksini metil fenil piridin (MPP)'in üzerinde iyileştirici etki gözlenmiştir [92].

Fitoöstrojen Etki

Resveratrolün fitoöstrojen yapılarla benzerlik göstermesi nedeniyle, yüksek dozlarda meme kanserine karşı sitotoksik özellik gösterdiği bulunmuştur. Bowers ve arkadaşları tarafından, resveratrolün alfa (α) ve β -östrojen reseptörlerinde agonist ve antagonist aktivite oluşturduğu gösterilmiştir [93]. Bu bilgilerin ışığında, resveratrol ve östradiol kombinasyonunun tedavide östrojen reseptörü (ER) pozitif hücre hattı MCF-7 ve ER negatif hücre hattı MDA-MB-468 üzerinde yapılan bir çalışmada; 10 μ mol/L konsantrasyonda resveratrolün meme kanserindeki MCF-7 hücrelerinde 1 nmol/L östrodiolün uyardığı hücre büyümesini otokrin büyüme modülatörlerinin ekspresyonunu değiştirerek inhibe ettiği gösterilmiştir. Aynı zamanda ER negatif olan meme kanseri hücre hattı MDA-MB-468 üzerinde de hücre proliferasyonunu alternatif bir mekanizma ile otokrin büyüme modülatörlerini ve reseptörlerini etkileyerek inhibe ettiği bulunmuştur [94]. Yapılan bir *in vivo* çalışmada; yumurtalıkları sağlam dişi sıçanlarda, resveratrol tüketimi sonucu vücut ağırlığında azalma, östrojen siklusunda bozulma ve yumurtalık hipertrofinde uyarılma meydana gelmiştir. Overektomi yapılan dişi sıçanlarda, resveratrol (10-1000 μ g)enjeksiyonu sonucu 17 β -östradiolbenzoat (EB)'da olduğu gibi davranışsal kaynaklı tepkiler, onu izleyen östrojen duyarlılığı ve sosyoseksüel davranış görülmemiştir. Mevcut *in vitro* çalışmalar, son *in vitro* bulgularda yer alan; resveratrolün diğer fitoöstrojenlerden farklı olarak agonist/antagonist karışık olarak etki ettiği, uygunluğuna bağlı olarak üreme sistemindeki ve dişi sıçan beynindeki spesifik östrojen reseptör izoformlarında lokalize olduğu bilgilerini desteklemektedir [95].

Göz Üzerine Etkisi

Resveratrolün vasküler güçlendirici özellikleri sayesinde gözün mikro sirkülasyonunda etkili olabileceği ve yaşa bağlı makula dejenerasyonu, diyabetik retinopati ve glokom gibidünya çapında görme kaybı yaygınlığından sorumlu hastalıkların önlenmesine yardımcı olabileceği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [21].

Yaşam Süresini Uzatma Etkisi

Howitz ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, resveratrolün DNA stabilitesini artırdığını ve kalori kısıtlamasının etkilerini taklit eden sirtuin ailesinin bir üyesi olan Sir2'yi aktive ederek tomurcuklanan maya *Saccharomyces cerevisiae*'nin ömrünü % 70 uzattığı belirtilmiştir [96]. Ayrıca resveratrol, *Drosophila melanogaster* ve *Caenorhabditis elegans*'ta Sir2'nin aktivasyonu ve C.

elegans'ta SIRT1'e bağlı otofajinin indüklenmesi yoluyla ömrü uzatmıştır [97, 98]. Diğer bir deyişle resveratrolün yaşam süresini uzatan sirtuin deasetilaz genlerinden SIRT1, SIRT3, SIRT4 genlerinin ve FoxO1, Foxo3a, PBEF gibi genlerin ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir [99]. Rascón ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptığı bir çalışmada da, 30 µm ve 130 mM resveratrol uygulamalarının bal arılarının ortalama ömrünü sırasıyla %38 ve %33 uzattığı gösterilmiştir [100]. Diyet ile alınan resveratrolün, yüksek kalorili diyetle beslenen farelerin ömrünü; artan insülin duyarlılığı, azalmış IGF-I seviyeleri, artmış AMPK ve PGC-1a aktiviteleri, yüksek mitokondri sayısı ve geliştirilmiş motor fonksiyonu dahil olmak üzere sağlıklı ilişkili fizyolojik koşullarını iyileştirerek önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir [26]. Hernández-Hernández ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da yaşlı farelere (18 aylık) vücut ağırlıklarına göre günlük 20 mg/kg resveratrolün 60 gün süreyle oral yoldan verilmesinin; prefrontal korteks, dorsal hipokampus ve dentat girusda dendritik morfolojinin modifikasyonunu önemli ölçüde indüklediği gösterilmiştir. Bilim insanları bu etkilerle resveratrolün yaşlanma ve Alzheimer hastalığındaki terapötik etkisini açıklayabileceğini öne sürmüşlerdir [101].

Enzimler Üzerine Etki

Yapılan *in vitro* çalışmalarda resveratrolün enzimatik aktivitesinin, sitokrom P450s (CYPs) inhibisyonu üzerinden gerçekleştiği aynı zamanda aril hidrokarbon reseptörlerinin (AHR) antagonizmasına bağlı olarak transkripsiyonu bloke ettiği gösterilmiştir [102]. Ayrıca ornitin dekarboksilaz enzimini (ODC) direkt inhibe etmediği, fakat enzimin *in vivo* ekspresyonunu ve karsinogenler tarafından indüksiyonunu azalttığı belirtilmiştir [103].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Resveratrol; üzüm, yer fıstığı, asma, çilek, kıvılcık, yaban mersini, dağ mersini, antep fıstığı, hurma, domates gibi besin kaynaklarında bulunmakta ve özellikle renkli üzüm varyetelerinin kabuk kısımlarında yüksek oranda sentezlenmektedir (Tablo 1). Üzüm içeriğindeki resveratrol miktarının; üzümün çeşidine, coğrafik kökenine ve olası bir mantar enfeksiyonu geçirmiş olmasına bağlı olarak farklılık gösterdiği saptanmıştır. Resveratrolün yapısal olarak *trans*- formu baskın olmak üzere *cis*- ve *trans*- formlarında bulunduğu ve aynı zamanda glikozillenmiş formunun daha stabil ve oksidatif bozunmaya karşı dayanıklı olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle resveratrolün bitkilerde genellikle glikozitleri halinde bulunduğu bildirilmiştir. Resveratrol eldesinde önemli bir yere sahip olan *Polygonum cuspidatum* bitkisinin çeşitli ekstreleri, ticari önemi olan ürünlerin ortaya çıkmasını sağlamıştır.

Resveratrol üzerinde yapılan çalışmalar ilk yıllarda resveratrolün kardiyoprotektif özellikleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu özellikler resveratrolün kırmızı şarapta yüksek konsantrasyonda bulunması ve bunun üzerine 'Fransız Paradoksu' kavramının ortaya atılmasıyla öne çıkmıştır. Bu kavrama göre

Fransız toplumunun kalp ve damar hastalıkları oranının az olması, Fransız toplumunun sıkça tükettiği kırmızı şarap içeriğindeki resveratrole bağlanmıştır. Birçok çalışma ile resveratrolün antiinflamatuvar etkilerini TNF- α , iNOS ve COX-2'yi inhibe ederek gösterdiği, IL-1b, IL-10, PGES-1, p38 MAPK sinyal yolunun aşağı-regülasyonu yoluyla kronik enflamasyonda azalmaya katkı sağladığı ortaya konmuştur.

Resveratrolün birçok tıbbi etkisinin altında temel olarak antioksidan etkisi yatmaktadır ve LDL oksidasyonunu engellediği konusunda birçok araştırmacı hemfikir olmuştur. Yine resveratrolün nöroprotektif ve nörodejenerasyon üzerindeki olumlu etkisini de antioksidan özelliğiyle sağladığı bu sayede Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda da önem kazandığı bulunmuştur. Ayrıca resveratrolün yaşam süresini uzatan sirtuin deasetilaz genlerinden SIRT1, SIRT3, SIRT4 genlerinin ve FoxO1, Foxo3a, PBEF gibi genlerin ekspresyonunu uyardığı ve alt organizmaların yaşam süresini uzatma etkisine sahip olduğu belirtilmiştir. Tip II diyabetik hastalarda da HbA1c ile sistolik kan basıncını önemli ölçüde azaltması, tedavide yer alabileceğini göstermektedir.

Son yıllarda ise daha çok resveratrolün antikanser özelliği üzerinde yoğunlaşmıştır. Kolon, prostat, yumurtalık, cilt, meme, akciğer, pankreas, lenfoma ve lösemiye ait kanser hücreleri üzerinde çalışmalar mevcuttur [82].

Resveratrolün MERS-CoV enfeksiyonundan sonraki uzun süreli hücresel hayatta kalmayı önemli ölçüde inhibe etmesi ve MERS-CoV replikasyonu için gerekli olan N proteini ekspresyonunun azalmasına yardımcı olması umut vadetmektedir. Ayrıca resveratrol, İnfluenza virüsü enfeksiyonundareplikasyon, protein sentezi, gen ekspresyonu ve nükleik asit sentezinin inhibisyonları ile ilişkili olarak antiviral etkinlik sergilemektedir.

Son yıllarda resveratrolün ışığa maruz kaldığında kararsız bir yapı sergilemesi nedeniyle, biyolojik etkisini koruyabilmesi için katı lipid nanopartiküller gibi enkapsülasyon teknikleri kullanılarak hazırlanan, kontrollü salınımı olan ve daha etkili formülasyonlarla ilgili çeşitli araştırmaların yapılmakta olduğu görülmektedir [104]. Özellikle resveratrolün stabilitesini ve oral biyoyararlanımını iyileştirmek amacıyla güvenli ve etkili taşıyıcı olarak hazırlanan zein nanopartikülleri de öne çıkmaktadır [105].

Sonuç olarak; resveratrol ülkemizde de bulunan birçok besinde ve bitkisel kaynaktan önemli miktarda yer almakta, düşük dozda belirgin bir toksisite göstermemekte ve doza bağlı olarak önemli *in vitro/in vivo* biyolojik etkinlikleri bulunmaktadır. Günlük hayatımızda gerek gıda/nutrasötik gerekse ilaç şeklinde alınabileceği, çağımızın en önemli sorunlarından olan kanser başta olmak üzere, kalp, beyin, göz sağlığı için koruyucu olarak kullanılabileceği ve geliştirilecek formülasyonlarının daha iyi etkinlik sağlayacağı kanaatine varılmıştır.

YAZAR KATKILARI

Kavram: A.K.-U., S.G.; Tasarım: A.K.-U., S.G.; Denetim: A.K.-U.; Veri Toplama ve/veya İşleme: A.K.-U., S.G., Ü.U.; Analiz ve/veya Yorumlama: S.G., A.K.-U., Ü.U.; Literatür Taraması: S.G., A.K.-U., Ü.U.; Makalenin Yazılması: S.G., A.K.-U., Ü.U.; Kritik İnceleme: A.K.-U., S.G., Ü.U.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

1. Érsek, T., Király, Z. (1986). Phytoalexins: Warding-off compounds in plants?. *Physiologia Plantarum*, 68(2), 343-346. [\[CrossRef\]](#)
2. Hasan, M., Bae, H. (2017). An overview of stress-induced resveratrol synthesis in grapes: perspectives for resveratrol-enriched grape products. *Molecules*, 22(2), 294. [\[CrossRef\]](#)
3. Takaoka, M.J. (1940). Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). *Journal Faculty Science Hokkaido Imperial University*, 3, 1-16.
4. Goldberg, D.M., Ng, E., Yan, J., Karumanchiri, A., Soleas, G.J., Diamandis, E.P. (1996). Regional differences in resveratrol isomer concentrations of wines from various cultivars. *Journal of Wine Research*, 7(1), 13-24. [\[CrossRef\]](#)
5. Park, E.J., Pezzuto, J.M. (2015). The pharmacology of resveratrol in animals and humans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1852(6), 1071-1113. [\[CrossRef\]](#)
6. Colica, C., Milanović, M., Milić, N., Aiello, V., De Lorenzo, A., Abenavoli, L. (2018). A systematic review on natural antioxidant properties of resveratrol. *Natural Product Communications*, 13(9), 1195-1203. [\[CrossRef\]](#)
7. Tian, B., Liu, J. (2020). Resveratrol: A review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(4), 1392-1404. [\[CrossRef\]](#)
8. Sanders, T.H., McMichael, R.W., Hendrix, K.W. (2000). Occurrence of resveratrol in edible peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1243-1246. [\[CrossRef\]](#)
9. Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M.E., Crozier, A. (2002). Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3337-3340. [\[CrossRef\]](#)

10. Sparvoli, F., Martin, C., Scienza, A., Gavazzi, G., Tonelli, C. (1994). Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Molecular Biology*, 24(5), 743-755. [\[CrossRef\]](#)
11. Giovanazzo, G., Ingrosso, I., Paradiso, A., De Gara, L., Santino, A. (2012). Resveratrol biosynthesis: plant metabolic engineering for nutritional improvement of food. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(3), 191-199. [\[CrossRef\]](#)
12. Vrhovsek, U., Wendelin, S., Eder, R. (1997). Effects of various vinification techniques on the concentration of cis-and trans-resveratrol and resveratrol glucoside isomers in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(2), 214-219.
13. Versari, A., Parpinello, G.P., Tornielli, G.B., Ferrarini, R., Giulivo, C. (2001). Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting, and UV treatment in grape cv. Corvina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5531-5536. [\[CrossRef\]](#)
14. Mattivi, F., Reniero, F., Korhammer, S. (1995). Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(7), 1820-1823.
15. Lamuela-Raventos, R.M., Romero-Perez, A.I., Waterhouse, A.L., De La Torre-Boronat, M.C. (1995). Direct HPLC analysis of cis-and trans-resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(2), 281-283.
16. Jeandet, P., Bessis, R., Maume, B.F., Sbaghi, M. (1993). Analysis of resveratrol in Burgundy wines. *Journal of Wine Research*, 4(2), 79-85. [\[CrossRef\]](#)
17. Athar, M., Back, J.H., Tang, X., Kim, K.H., Kopelovich, L., Bickers, D.R., Kim, A.L. (2007). Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 224(3), 274-283. [\[CrossRef\]](#)
18. Cui, X., Jin, Y., Hofseth, A.B., Pena, E., Habiger, J., Chumanevich, A., Poudyal, D., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P.S., Singh, U.P., Hofseth, L.J. (2010). Resveratrol suppresses colitis and colon cancer associated with colitis. *Cancer Prevention Research*, 3(4), 549-559. [\[CrossRef\]](#)
19. Bhullar, K.S., Hubbard, B.P. (2015). Lifespan and healthspan extension by resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1852(6), 1209-1218. [\[CrossRef\]](#)
20. Lin, S.C., Ho, C.T., Chuo, W.H., Li, S., Wang, T.T., Lin, C.C. (2017). Effective inhibition of MERS-CoV infection by resveratrol. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), 144. [\[CrossRef\]](#)
21. Bola, C., Bartlett, H., Eperjesi, F.(2014). Resveratrol and the eye: activity and molecular mechanisms. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 252, 699-713. [\[CrossRef\]](#)
22. Liu, B.L., Zhang, X., Zhang, W., Zhen, H.N. (2007). New enlightenment of French Paradox: resveratrol's potential for cancer chemoprevention and anti-cancer therapy. *Cancer Biology & Therapy*, 6(12), 1833-1836. [\[CrossRef\]](#)
23. Udenigwe, C.C., Ramprasath, V.R., Aluko, R.E., Jones, P.J. (2008). Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. *Nutrition Reviews*, 66(8), 445-454. [\[CrossRef\]](#)

24. Ergin, K., Yaylalı, A. (2013). Resveratrol ve etkileri üzerine bir gözden geçirme. *Medical Journal of Suleyman Demirel University*, 20(3), 115-120.
25. Romero-Pérez, A.I., Ibern-Gómez, M., Lamuela-Raventós, R.M., de la Torre-Boronat, M.C. (1999). Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1533-1536. [\[CrossRef\]](#)
26. Baur, J.A., Sinclair, D.A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(6), 493-506. [\[CrossRef\]](#)
27. Cheynier, V., Schneider, R., Salmon, J.M., Fulcrand, H. (2010). *Chemistry of wine*. Elsevier, Oxford., 3, p. 1119-1172.
28. Frémont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*, 66(8), 663-673. [\[CrossRef\]](#)
29. Venugopal, R., Liu, R.H. (2012). Phytochemicals in diets for breast cancer prevention: The importance of resveratrol and ursolic acid. *Food Science and Human Wellness*, 1(1), 1-13. [\[CrossRef\]](#)
30. Kuhnle, G., Spencer, J.P., Chowrimootoo, G., Schroeter, H., Debnam, E.S., Srai, S.K.S., Rice-Evans, C., Hahn, U. (2000). Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272(1), 212-217. [\[CrossRef\]](#)
31. Chukwumah, Y., Walker, L., Vogler, B., Verghese, M. (2011). *In vitro* absorption of dietary trans-resveratrol from boiled and roasted peanuts in Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23), 12323-12329. [\[CrossRef\]](#)
32. Wang, W.X., Qian, J.Y., Wang, X.J., Jiang, A.P., Jia, A.Q. (2014). Anti-HIV-1 activities of extracts and phenolics from *Smilax china* L. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27, 147-151.
33. Menezes, J.C., Diederich, M.F. (2019). Natural dimers of coumarin, chalcones, and resveratrol and the link between structure and pharmacology. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 182, 111637. [\[CrossRef\]](#)
34. Huang, X.T., Li, X., Xie, M.L., Huang, Z., Huang, Y.X., Wu, G.X., Peng, Z.R., Sun, Y.N., Ming, Q.L., Liu, Y.X., Chen, J.P., Xu, S.N. (2019). Resveratrol: Review on its discovery, anti-leukemia effects and pharmacokinetics. *Chemico-biological Interactions*, 306, 29-38. [\[CrossRef\]](#)
35. Polonini, H. C., de Almeida Bastos, C., de Oliveira, M.A.L., da Silva, C.G.A., Collins, C.H., Brandão, M.A. F., Raposo, N.R.B. (2014). *In vitro* drug release and *ex vivo* percutaneous absorption of resveratrol cream using HPLC with zirconized silica stationary phase. *Journal of Chromatography B*, 947, 23-31. [\[CrossRef\]](#)
36. Andres-Lacueva, C., Macarulla, M.T., Rotches-Ribalta, M., Boto-Ordóñez, M., Urpi-Sarda, M., Rodríguez, V.M., Portillo, M.P. (2012). Distribution of resveratrol metabolites in liver, adipose tissue, and skeletal muscle in rats fed different doses of this polyphenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(19), 4833-4840. [\[CrossRef\]](#)

37. Lastra, C., Villegas, I. (2005). Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(5), 405-430. [\[CrossRef\]](#)
38. Wang, P., Sang, S. (2018). Metabolism and pharmacokinetics of resveratrol and pterostilbene. *BioFactors*, 44(1), 16-25. [\[CrossRef\]](#)
39. Crowell, J.A., Korytko, P.J., Morrissey, R.L., Booth, T.D., Levine, B.S. (2004). Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicological Sciences*, 82(2), 614-619. [\[CrossRef\]](#)
40. Williams, L.D., Burdock, G.A., Edwards, J.A., Beck, M., Bausch, J. (2009). Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9), 2170-2182. [\[CrossRef\]](#)
41. Keskin, N., Noyan, T., Kunter, B. (2009). Resveratrol ile Üzümden Gelen Sağlık. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Science*, 29(5), 1273-1279.
42. Hurst, W.J., Glinski, J.A., Miller, K.B., Apgar, J., Davey, M.H., Stuart, D.A. (2008). Survey of the trans-resveratrol and trans-piceid content of cocoa-containing and chocolate products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8374-8378. [\[CrossRef\]](#)
43. Shrikanta, A., Kumar, A., Govindaswamy, V. (2015). Resveratrol content and antioxidant properties of underutilized fruits. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 383-390. [\[CrossRef\]](#)
44. Sobolev, V.S., Cole, R.J. (1999). trans-Resveratrol content in commercial peanuts and peanut products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1435-1439. [\[CrossRef\]](#)
45. Ibern-Gómez, M., Roig-Perez, S., Lamuela-Raventós, R. M., de la Torre-Boronat, M. C. (2000). Resveratrol and piceid levels in natural and blended peanut butters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), 6352-6354. [\[CrossRef\]](#)
46. Tokuşoğlu, Ö., Ünal, M.K., Yemiş, F. (2005). Determination of the phytoalexin resveratrol (3, 5, 4'-trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography– mass spectrometry (GC-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 5003-5009. [\[CrossRef\]](#)
47. Soleas, G.J., Diamandis, E.P., Goldberg, D.M. (1997). Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone?. *Clinical Biochemistry*, 30(2), 91-113. [\[CrossRef\]](#)
48. Tzanova, M., Peeva, P. (2018). Rapid HPLC method for simultaneous quantification of trans-resveratrol and quercetin in the skin of red grapes. *Food Analytical Methods*, 11(2), 514-521. [\[CrossRef\]](#)
49. Sebastià, N., Montoro, A., León, Z., Soriano, J.M. (2017). Searching trans-resveratrol in fruits and vegetables: a preliminary screening. *Journal of Food Science and Technology*, 54(3), 842-845. [\[CrossRef\]](#)
50. Wang, Y., Catana, F., Yang, Y., Roderick, R., van Breemen, R.B. (2002). An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 431-435. [\[CrossRef\]](#)

51. Lyons, M.M., Yu, C., Toma, R.B., Cho, S.Y., Reiboldt, W., Lee, J., van Breemen, R.B. (2003). Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(20), 5867-5870. [\[CrossRef\]](#)
52. Rimando, A.M., Kalt, W., Magee, J.B., Dewey, J., Ballington, J.R. (2004). Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in vaccinium berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4713-4719. [\[CrossRef\]](#)
53. Callemien, D., Jerkovic, V., Rozenberg, R., Collin, S. (2005). Hop as an interesting source of resveratrol for brewers: optimization of the extraction and quantitative study by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 424-429. [\[CrossRef\]](#)
54. Jerkovic, V., Callemien, D., Collin, S. (2005). Determination of stilbenes in hop pellets from different cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4202-4206. [\[CrossRef\]](#)
55. Counet, C., Callemien, D., Collin, S. (2006). Chocolate and cocoa: New sources of *trans*-resveratrol and *trans*-piceid. *Food Chemistry*, 98(4), 649-657. [\[CrossRef\]](#)
56. Mark, L., Nikfardjam, M.S.P., Avar, P., Ohmacht, R. (2005). A validated HPLC method for the quantitative analysis of *trans*-resveratrol and *trans*-piceid in Hungarian wines. *Journal of Chromatographic Science*, 43(9), 445-449. [\[CrossRef\]](#)
57. Yaman, Ü.R., Yıldırım, H.K., Adıgüzel, B., Yücel, U. (2013). Farklı Bölgelere Ait Ticari Şarapların Resveratrol İçerikleri. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*, 11(3-4), 40-46.
58. Tatarczak-Michalewska, M., Blicharska, E., Flieger, J. (2017). Correlation of metal and *trans*-resveratrol concentrations in red wine. *Analytical Letters*, 50(12), 2023-2029. [\[CrossRef\]](#)
59. Šćepanović, R.P., Wendelin, S., Raičević, D., Eder, R. (2019). Characterization of the phenolic profile of commercial Montenegrin red and white wines. *European Food Research and Technology*, 245(10), 2233-2245. [\[CrossRef\]](#)
60. Goldberg, D.M., Yan, J., Ng, E., Diamandis, E.P., Karumanchiri, A., Soleas, G., Waterhouse, A.L. (1995). A global survey of *trans*-resveratrol concentrations in commercial wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(2), 159-165.
61. Sautter, C.K., Denardin, S., Alves, A.O., Mallmann, C.A., Penna, N.G., Hecktheuer, L.H. (2005). Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. *Food Science and Technology*, 25(3), 437-442. [\[CrossRef\]](#)
62. Concenco, F.I., Brotto, G.F., Nora, L. (2019). Grape Wine and Juice: Comparison on Resveratrol Levels. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science*, 6(4), 378-386. [\[CrossRef\]](#)
63. Sánchez-Fidalgo, S., Cárdeno, A., Villegas, I., Talero, E., de la Lastra, C.A. (2010). Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic inflammation in mice. *European Journal of Pharmacology*, 633(1-3), 78-84. [\[CrossRef\]](#)
64. Yao, L., Wan, J., Li, H., Ding, J., Wang, Y., Wang, X., Li, M. (2015). Resveratrol relieves gestational diabetes mellitus in mice through activating AMPK. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 118. [\[CrossRef\]](#)

65. Chang C.C., Lin K.Y., Peng K.Y., Day Y.J., Hung L.M. (2015). Resveratrol exerts anti-obesity effects in high-fat diet obese mice and displays differential dosage effects on cytotoxicity, differentiation, and lipolysis in 3T3-L1 cells. *Endocrine Journal*, 63, 169-178. [\[CrossRef\]](#)
66. Sayın, O., Arslanand, N., Güner, G. (2008). Resveratrol ve kardiyovasküler sistem. *Turkish Journal of Biochemistry*, 33(3), 117-121.
67. Leonard, S.S., Xia, C., Jiang, B.H., Stinefelt, B., Klandorf, H., Harris, G.K., Shi, X. (2003). Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309(4), 1017-1026. [\[CrossRef\]](#)
68. Uysal M. (2006). Serbest radikaller ve oksidatif stres. *Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul*, p. 829-835.
69. Vlachogianni, I.C., Fragopoulou, E., Kostakis, I.K., Antonopoulou, S. (2015). *In vitro* assessment of antioxidant activity of tyrosol, resveratrol and their acetylated derivatives. *Food Chemistry*, 177, 165-173. [\[CrossRef\]](#)
70. Zunino, S.J., Storms, D.H., Stephensen, C.B. (2007). Diets rich in polyphenols and vitamin A inhibit the development of type I autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *The Journal of Nutrition*, 137(5), 1216-1221. [\[CrossRef\]](#)
71. Lee, J.A., Ha, S.K., Cho, E., Choi, I. (2015). Resveratrol as a bioenhancer to improve anti-inflammatory activities of apigenin. *Nutrients*, 7(11), 9650-9661. [\[CrossRef\]](#)
72. Ray, P.S., Maulik, G., Cordis, G.A., Bertelli, A.A., Bertelli, A., Das, D.K. (1999). The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(1-2), 160-169. [\[CrossRef\]](#)
73. Carrizzo, A., Puca, A., Damato, A., Marino, M., Franco, E., Pompeo, F., Traficante, A., Civitillo, F., Santini, L., Trimarco, V., Vecchione, C. (2013). Resveratrol improves vascular function in patients with hypertension and dyslipidemia by modulating NO metabolism. *Hypertension*, 62(2), 359-366. [\[CrossRef\]](#)
74. Miura, D., Miura, Y., Yagasaki, K. (2003). Hypolipidemic action of dietary resveratrol, a phytoalexin in grapes and red wine, in hepatoma-bearing rats. *Life Sciences*, 73(11), 1393-1400. [\[CrossRef\]](#)
75. Wang, Z., Zou, J., Cao, K., Hsieh, T.C., Huang, Y., Wu, J.M. (2005). Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. *International Journal of Molecular Medicine*, 16(4), 533-540. [\[CrossRef\]](#)
76. Lanzilli, G., Fuggetta, M.P., Tricarico, M., Cottarelli, A., Serafino, A., Falchetti, R., Ravagnan, G., Turriziani, M., Adamo, R., Franzese, O., Bonmassar, E. (2006). Resveratrol down-regulates the growth and telomerase activity of breast cancer cells *in vitro*. *International Journal of Oncology*, 28(3), 641-648. [\[CrossRef\]](#)
77. Schneider, Y., Vincent, F., Durantou, B., Badolo, L., Gossé, F., Bergmann, C., Seiler, N., Raul, F. (2000). Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Letters*, 158(1), 85-91. [\[CrossRef\]](#)

78. Sheth, S., Jajoo, S., Kaur, T., Mukherjea, D., Sheehan, K., Rybak, L.P., Ramkumar, V. (2012). Resveratrol reduces prostate cancer growth and metastasis by inhibiting the Akt/MicroRNA-21 pathway. *PloS One*, 7(12). [\[CrossRef\]](#)
79. Selvaraj, S., Sun, Y., Sukumaran, P., Singh, B.B. (2016). Resveratrol activates autophagic cell death in prostate cancer cells via downregulation of STIM1 and the mTOR pathway. *Molecular Carcinogenesis*, 55(5), 818-831. [\[CrossRef\]](#)
80. Gomes, L., Sorgine, M., Passos, C.L.A., Ferreira, C., de Andrade, I.R., Silva, J.L., Atella, G.C., Mermelstein, C.S., Fialho, E. (2019). Increase in fatty acids and flotillins upon resveratrol treatment of human breast cancer cells. *Scientific Reports*, 9(1), 1-11. [\[CrossRef\]](#)
81. Schmitt, E., Lehmann, L., Metzler, M., Stopper, H. (2002). Hormonal and genotoxic activity of resveratrol. *Toxicology Letters*, 136(2), 133-142. [\[CrossRef\]](#)
82. Gündoğdu, S., Uz, A. (2021). Resveratrol'ün kanser hücreleri üzerine etkisi. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi* (yayına gönderildi).
83. Fuggetta, M., Mattivi, F. (2011). The immunomodulating activities of resveratrol glucosides in humans. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 3(2), 81-90. [\[CrossRef\]](#)
84. Abba, Y., Hassim, H., Hamzah, H., Noordin, M.M. (2015). Antiviral activity of resveratrol against human and animal viruses. *Advances in Virology*. [\[CrossRef\]](#)
85. Yücel, Ç., Karatoprak, G.Ş., Atmar, A. (2018). Novel resveratrol-loaded nanocochleates and effectiveness in the treatment of diabetes. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43(2), 35-44.
86. Do, G.M., Jung, U.J., Park, H.J., Kwon, E.Y., Jeon, S.M., McGregor, R.A., Choi, M.S. (2012). Resveratrol ameliorates diabetes-related metabolic changes via activation of AMP-activated protein kinase and its downstream targets in db/db mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(8), 1282-1291. [\[CrossRef\]](#)
87. Yang, D.K., Kang, H.S. (2018). Anti-diabetic effect of cotreatment with quercetin and resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomolecules & Therapeutics*, 26(2), 130. [\[CrossRef\]](#)
88. Oomen, C.A., Farkas, E., Roman, V., Van Der Beek, E.M., Luiten, P.G., Meerlo, P. (2009). Resveratrol preserves cerebrovascular density and cognitive function in aging mice. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 1, 4. [\[CrossRef\]](#)
89. Quincozes-Santos, A., Gottfried, C. (2011). Resveratrol modulates astroglial functions: neuroprotective hypothesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215(1), 72-78. [\[CrossRef\]](#)
90. Robb, E.L., Stuart, J.A. (2010). *trans*-Resveratrol as a neuroprotectant. *Molecules*, 15(3), 1196-1212. [\[CrossRef\]](#)
91. Khan, R.S., Fonseca-Kelly, Z., Callinan, C., Zuo, L., Sachdeva, M.M., Shindler, K.S. (2012). SIRT1 activating compounds reduce oxidative stress and prevent cell death in neuronal cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 6, 63. [\[CrossRef\]](#)

92. Bournival, J., Quessy, P., Martinoli, M.G. (2009). Protective effects of resveratrol and quercetin against MPP⁺-induced oxidative stress act by modulating markers of apoptotic death in dopaminergic neurons. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 29(8), 1169-1180. [\[CrossRef\]](#)
93. Bowers, J.L., Tyulmenkov, V.V., Jernigan, S.C., Klinge, C.M. (2000). Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors α and β . *Endocrinology*, 141(10), 3657-3667. [\[CrossRef\]](#)
94. Serrero, G., Lu, R. (2001). Effect of resveratrol on the expression of autocrine growth modulators in human breast cancer cells. *Antioxidants and Redox Signaling*, 3(6), 969-979. [\[CrossRef\]](#)
95. Henry, L.A., Witt, D.M. (2002). Resveratrol: phytoestrogen effects on reproductive physiology and behavior in female rats. *Hormones and Behavior*, 41(2), 220-228. [\[CrossRef\]](#)
96. Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.L., Scherer, B.B., Sinclair, D.A. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425(6954), 191-196. [\[CrossRef\]](#)
97. Morselli, E., Maiuri, M.C., Markaki, M., Megalou, E., Pasparaki, A., Palikaras, K., Criollo, A., Galluzzi, L., Malik, S.A., Vitale, I., Michaud, M., Madeo, F., Tavernarakis, N., Kroemer, G. (2010). Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell Death & Disease*, 1(1), e10. [\[CrossRef\]](#)
98. Wood, J.G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S.L., Tatar, M., Sinclair, D. (2004). Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*, 430(7000), 686-689. [\[CrossRef\]](#)
99. Das, D.K., Mukherjee, S., Ray, D. (2010). Erratum to: resveratrol and red wine, healthy heart and longevity. *Heart Failure Reviews*, 15, 467-477. [\[CrossRef\]](#)
100. Rascón, B., Hubbard, B.P., Sinclair, D.A., Amdam, G.V. (2012). The lifespan extension effects of resveratrol are conserved in the honey bee and may be driven by a mechanism related to caloric restriction. *Ageing (Albany NY)*, 4(7), 499-508. [\[CrossRef\]](#)
101. Hernández-Hernández, E.M., Serrano-García, C., Antonio Vázquez-Roque, R., Díaz, A., Monroy, E., Rodríguez-Moreno, A., Florán, B., Flores, G. (2016). Chronic administration of resveratrol prevents morphological changes in prefrontal cortex and hippocampus of aged rats. *Synapse*, 70(5), 206-217. [\[CrossRef\]](#)
102. Yu, C., Shin, Y.G., Kosmeder, J.W., Pezzuto, J.M., van Breemen, R.B. (2003). Liquid chromatography/tandem mass spectrometric determination of inhibition of human cytochrome P450 isozymes by resveratrol and resveratrol-3-sulfate. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17(4), 307-313. [\[CrossRef\]](#)
103. Kanduja, K.L., Hardwaj, A., Kaushik, G. (2004). Resveratrol inhibits N-nitrosodiethylamine-induced ornithine decarboxylase and cyclooxygenase in mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 50(1), 61-65. [\[CrossRef\]](#)
104. Soldati, P.P., Polonini, H.C., Paes, C.Q., Restrepob, J.A., Creczynski-Pasa, T.B., Chaves, M.G., Brandao, M.A.F., Pittella, F., Raposo, N.R. (2018). Controlled release of resveratrol from lipid nanoparticles improves antioxidant effect. *IFAC-PapersOnLine*, 51(27), 16-21. [\[CrossRef\]](#)

105. Nunes, R., Baião, A., Monteiro, D., das Neves, J., Sarmiento, B. (2020). Zein nanoparticles as low-cost, safe, and effective carriers to improve the oral bioavailability of resveratrol. *Drug Delivery and Translational Research*, 10(3), 826-837. [\[CrossRef\]](#)



ALOE VERA (L.) BURM. F. (SARISABIR) BİTKİSİNİN FİTOTERAPİDE KULLANIMI

USAGE OF ALOE VERA (L.) BURM. F. (SARISABIR) PLANT IN PHYTOTHERAPY

Hilal Ahsen TUNÇAY^{1,3} , Gülen İrem KAYA^{2,3*} 

¹Manisa İl Sağlık Müdürlüğü, 45110, Manisa, Türkiye

²Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 35040, İzmir, Türkiye

³Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 35100, İzmir, Türkiye

ÖZ

Amaç: *Aloe barbadensis* Miller veya bilinen adıyla *Aloe vera*, sukulent türü, etli ve dikenli yaprakları olan çok yıllık bir bitkidir. *A. vera* yapraklarından elde edilen jel ve usarenin kimyasal bileşen yapısı ve kullanım alanları birbirinden oldukça farklıdır. Bu çalışmada, yapraklardan elde edilen bu ürünlerin iyileştirici veya sağlığını koruması amaçlarıyla dâhilen veya haricen kullanıldığı alanlar incelenmiştir.

Sonuç ve Tartışma: *A. vera*'nin geniş kimyasal bileşen içeriği olduğu ve bitkiden saflaştırılan bu bileşenlerle ilişkilendirilen biyolojik aktiviteler bulunduğu bilinmektedir. Genel olarak varılan yargı, bitki bütününe çoğu farmakolojik etkinlikte, saflaştırılan bileşenlerin tek başına gösterdiği aktiviteden daha güçlü olduğu ve bitki bileşenlerinin hep birlikte sinerjik etki gösterdiği yönündedir. Gelişen teknoloji ile birlikte, bitki yapraklarının yara iyileşmesini destekleyici, antiinflamatuar ve antimikrobiyal etkilerinin, daha geniş uygulama alanlarına ışık tuttuğu görülmektedir. Özellikle jelin, nanoteknoloji ve diğer ileri yöntemler kullanılarak yara pansuman malzemelerinin, kumaşların, antibakteriyel ürünlerin, kişisel bakım ürünlerinin içeriğine eklenmesi, bitkinin bu terapötik özelliklerinden faydalanabileceğimiz daha geniş kullanım alanları yaratmaktadır. Endüstri alanındaki gelişmelerin takip edilerek, bitkinin tedavi edici niteliklerinden en üst seviyede yararlanabileceğimiz, etkili, güvenli ve doğal içerikli ürünlerin geliştirilmesi için multidisipliner çalışmaların yürütülmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Aloe vera*, *Aloe vera* jel, *Aloe vera* usare, Fitoterapi

ABSTRACT

Objective: *Aloe barbadensis* Miller, also known as *Aloe vera* is a perennial succulent plant with fleshy and jagged leaves. The chemical composition and usage areas of *A. vera* leaf products, gel and latex, are quite different from each other. The present study aims to investigate usage of the leaf products as topical and oral therapeutic and disease prevention.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Gülen İrem Kaya
e-posta / e-mail: gulen.irem.kaya@ege.edu.tr, Tel./ Phone: +902323904079

Result and Discussion: *A. vera* has a wide content of chemical components and biological activities associated with these components purified from the plant. Generally reached judgment is that the whole plant is stronger in most pharmacological activity than the extracted ingredients alone, and that the plant components together exert synergistic effect. With the advancing technology, it is seen that the anti-inflammatory and antimicrobial effects of plant leaves that support wound healing shed light on wider application areas. Especially the addition of gel to the content of wound dressings, fabrics, antibacterial products and personal care products using nanotechnology and other advanced methods creates wider areas of use where we can benefit from these therapeutic properties of the plant. By following the developments in the field of industry, multidisciplinary studies should be carried out in order to develop effective, safe and natural products that we can benefit from the therapeutic qualities of the plant at the highest level.

Keywords: *Aloe vera*, *Aloe vera gel*, *Aloe vera latex*, *Phytotherapy*

GİRİŞ

Aloe barbadensis Miller veya bilinen adıyla *Aloe vera*, anavatanı Afrika, Arap Yarımadası ve Hint Okyanusu Adaları olan, skulent türü bir bitkidir. Ait olduğu familya zaman içinde birkaç kez değiştirilse de, güncel sınıflandırmada Asphodelaceae olarak kabul edilmiştir. Yunan kökenli “aloe (*aloi*)” kelimesinin, “acı” anlamına gelen Arapça “alloe” veya “alloe” ya da İbranice “allal” kelimelerinden türediği düşünülmektedir. Latince olan “vera” ise yine Arapça’da gerçek, hakiki anlamına gelen “wahre” kelimesinden türemiştir. Kılıç şeklinde olan yapraklarından dolayı halk arasında kullanılan adı Arapça “saber” (kılıç) kelimesinden gelmekte ve genellikle sarı renkli çiçekler açtığından Anadolu’da “sarısabır” olarak anılmaktadır. Ülkemizde Antalya’nın Demre ilçesinde ve güneybatı sahillerinde doğal olarak yetişmektedir [1-5].

Genel Özellikleri

Aloe vera, çok yıllık, etli ve dikenli yaprakları olan bir bitkidir. Kökü, açık kahverengi, güçlü ve lifli dokudadır. Alt yaprakları soyuldukça ortaya çıkan, 25-30 cm’e kadar uzayabilen odunsu bir gövde ve bu gövdede 25’e yakın sıkışık yerleşmiş dikey yapraklar bulunmaktadır [6–8]. Bitkinin boyu 60-100 cm arasında olabilmektedir [9].

Aloe vera yaprağının enine bir kesiti mikroskop altında incelendiğinde, epidermis, klorenkima ve damar demetleri (damarlı tabaka) ile jeli içeren renksiz iç parankima dokusundan oluştuğu görülmektedir (Resim 1) [6]. Parankima hücreleri tarafından depolanan *A. vera* jelinin bulunduğu şeffaf ve yapışkan bölüm “jel”, “öz”, “musilaj tabaka”, “sulu doku” veya “mezofil” olarak da isimlendirilir [6,10,11]. Yaprağın kabuk kısmı ile iç kısmı arasında, yaprak içi bölümünün çeperini baştan sona kaplamış olan, “usare”, “lateks”, “*Aloe* suyu” veya “aloe” de denen *A. vera* özsuyunun üretildiği damar demetleri bulunmaktadır. [6].

Kimyasal Bileşimi ve Biyolojik Aktiviteleri

A. vera yaprak kütlelerinin % 20-30’unu kabuk tabakasının; % 70-80’ini yaprak içi (öz) kısmının oluşturduğu bildirilmiştir. Yaprak içi bölümünün çeşitli mekanik işlemlerle ezilip sıkılmasıyla da yaklaşık % 70 verimle (100 g yaprak içi özünden 70 g) jel elde edilmektedir [12,13].

A. vera yapraklarının % 99-99,5'ini su oluştururken; geri kalan katı madde bölümü ise yaklaşık 200 çeşit biyolojik aktif bileşen içermektedir [6]. Bitkide yer alan bileşenler, polisakkaritler, şekerler, lipidler, steroller, yağ asitleri, aminoasitler, glikoproteinler, enzimler, hormonlar, organik asitler, vitaminler, mineraller, antron ve antrakinonlar, kromonlar, flavonoidler, tanenler, kumarinler, diğer fenolik bileşenler ve saponinler olarak özetlenebilmektedir [6,14]. *A. vera* yaprağında tanımlanmış olan kimyasal bileşenler Tablo 1'de gösterilmiştir [6,10,14–19].

Tablo 1. *Aloe vera* yaprağında tanımlanmış kimyasal bileşenler

Polisakkaritler	Antron ve Antrakinonlar	Yağ asitleri	Vitaminler	Aminoasitler	Mineraller
Asetillenmiş glukomannan	Aloe-emodin	Kaprik asit	β -Karoten	Arjinin	Potasyum
Asidik galaktan	Aloin A (Barbaloin)	Laurik asit	B1	Aspartik asit	Sodyum
Mannan	Aloin B (Izobarbaloin)	Miristik asit	B2	Glutamik asit	Bakır
Glukomannan	7-Hidroksialoin	Pentadekanoik asit	B6	Serin	Çinko
Arabinogalaktan	Homonataloin	Palmitik asit	C	Histidin	Krom
Arabinan	Krisofanol	Margarik asit	Kolin	Lizin	Selenyum
Glukogalakto-mannan	Antranol	Stearik asit	D	Treonin	Alüminyum
Selüloz	Krisofanol glikozit	Palmitoleik asit	E (α -tokoferol)	Valin	Magnezyum
Pektinler	Tetrahidro-antrasen glikozit	Hekzadekadien-oik asit	Folik asit	Metionin	Kalsiyum
Poliüronit	Helmintosporin	Oleik asit	K	Lösün	Manganez
Şekerler	Aloesaponarin I	Linoleik asit	Niasinamid	İzolösün	Klor
Glikoz	Kromonlar	Linolenik asit	Organik asitler	Fenil alanin	Sülfür
Mannoz	Aloesin	Enzimler	Malik asit	Triptofan	Demir
Arabinoz	(Aloeresin B)	Amilaz	Sukkinik asit	Histidin	Lipidler
Ramnoz	Aloeresin A, C	Oksidaz	Laktik asit	Glutamin	Kolesterol
Fruktoz	ve D	Karboksi- peptidaz	p-Kumarik asit	Prolin	Kampesterol
Sükroz	p-Kumarolaloesin	Katalaz	Salisilik asit	Alanin	Sitosterol
Ksiloz	İzorabaikromon	Lipaz	Üronik asit	Tirozin	Trigliseritler
Glukuronik asit	Ferulolaloesin	Alkalen fosfataz	Ürik asit	Sistein	Lupeol
Fukoz	Aloeson	Selülaz	Sinnamik asit	Asparajin	Kamferenol
Galakturonik asit	Flavonoidler	Aliinaz	Fumarik asit	Glisin	
Hormonlar	Ligninler	Gloksalaz	Saponinler	Lektinler	Kumarinler

A. vera yapraklarının jel içeren yaprak içi bölümü ile usareyi içeren kabuk bölümü, kimyasal bileşen içeriği bakımından birbirlerinden oldukça farklıdır. Usarede, aloin A ve aloin B isimli antronlar başta olmak üzere, yaklaşık 80 çeşit fenolik bileşen bulunmaktadır. Daha çok ikincil metabolitlerin kaynağı olan usarede, antron, antrakinon ve kromonlar gibi fenolik bileşenlerin yanında; kuru ağırlık üzerinden % 16-63 oranında asitte çözünmeyen reçine (resin), önemli miktarda kül (% 24,5), usarenin

acı tadından sorumlu olan az miktarda uçucu yağ, polisakkarit ve serbest şeker bulunmaktadır [6,20,21]. Jeli içeren yaprak içi bölümünde ise yaklaşık % 72 oranla en çok bulunan bileşen karbonhidratlar (şekerler ve polisakkaritler) olup, bunu mineraller (% 16), lipidler (% 4), protein (% 7), fenolik bileşikler (% 1) takip etmektedir [22].

A. vera jelinde bulunan polisakkaritler, *A. vera* yaprağındaki karakteristik bileşenlerdir. Özellikle de “asemannan” olarak bilinen asetillenmiş polisakkaritler, birçok farmakolojik aktiviteyle ilişkilendirilmiştir ve diğer jel bileşenlerinden ayrı olarak, tek başına da biyolojik aktivite gösterebildikleri bilinmektedir [23].

Aloe Vera Bitkisinin Farmakolojik Etkileri

A. vera bitkisinin çeşitli rahatsızlıklarda tedavi edici olarak harici ve dâhili yolla kullanılan bölümleri, bitki yaprağının bütünü, damar demetlerinden salgılanan usaresi ve yaprakların etli bölümünde bulunan jelidir.

Laksatif Etki

Aloe vera usaresi; antron, antrakinon, serbest antron, diantron ve az miktarda serbest antrakinonlar gibi antrasen bileşenlerinin karışımını içermektedir [24]. Usaredaki majör C-glikozitleri barbaloin (aloin A) ve izobarbaloin (aloin B) metabolitleri, usarenin insanlar ve bazı hayvanlarda bağırsaklar üzerindeki katartik etkisinden sorumlu temel ajanlardır [13]. Kurutulmuş toz olarak veya çeşitli ekstraktları hazırlanarak oral yolla alınan *A. vera* usaresinin su ve sodyumun geri emilimini azaltıp, kalın bağırsakta hareketliliği uyararak kolon transitini hızlandırdığı; mukus ve klorür salınımını uyararak kolonda sıvı salınımını artırdığı; kolon nöronlarını direkt ve dolaylı yoldan uyararak kolonda hareketliliğin artmasını sağladığı ve bu yollarla laksatif etki gösterdiği belirtilmektedir [25,26].

Yara İyileştirici Etkisi

A. vera jelinin yara iyileştirici etkisi, içeriğindeki polisakkarit, şeker, organik asit, sterol, enzim, hormon, vitamin ve mineraller gibi bileşenlerin bir arada gösterdiği aktiviteye dayandırılmaktadır (Şekil 1) [27]. Hücre yenilenmesi ve yara iyileşmesinde etkili olan bu bileşenler, anjiyojenik (kan damarlarının oluşumunu uyarıcı), mitojenik (mitoz bölünmeyi uyarıcı), epitel hücrelerin büyümesini ve hücre çoğalmasını uyarıcı etkiye sahiptir [28-30]. Bunlara ek olarak jelin antimikrobiyal, antienflamatuvar ve immünstimülan özellikleri de yara iyileştirici etkisini destekleyici niteliktedir. Yapılan çalışmalar gerek taze jelin, gerekse β -sitosterol ve asetilmannan (asemannan) gibi bileşenlerinin, büyüme faktörü üretimini, anjiyojenezi, kollajen üretiminden sorumlu hücreler olan fibroblastların çoğalmasını, yara iyileşme sürecinde rol oynayan hücrelerin göçünü ve kollajen üretimini stimüle ettiğini ve kollajen yapısının güçlenmesini sağlayarak yara iyileşmesini hızlandırdığını göstermiştir [13,27,31-33]. *A. vera* bitkisinin yaprak bütünü ile jelinin yara iyileştirme etkinliklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, jelin, yaprak bütününe göre yara iyileşmesini daha fazla hızlandırdığı ortaya konmuştur [34].

Histopatolojik açıdan bakıldığında, yara iyileşme sürecinde *A. vera* jeli yassı epitel hücrelerin hızla büyümesini uyarmakta, dermal fibrovasküler ve kollajen dokunun yeniden şekillenmesini ve mikrosirkülasyonun artmasını desteklemekte, antiseptik, antibakteriyel ve antienflamatuvar özelliği ile enflamatuvar hücre infiltrasyonunu azaltabilmekte ve yara alanının temiz kalmasına destek olmaktadır. Bu etkileri neticesinde yanıklarda, derideki yara yüzeyinde daha erken epitelizasyon gözlenmesini ve kısmi deri kalınlığının artmasını sağlayabilmektedir [35,36].

Jelde bulunan polisakkaritlerin büyük bölümünü oluşturan glukomannanlar, yara iyileştirme ve hücre çoğalmasında etkili jel bileşenlerinden biridir [37]. Bir glukomannan türü olan asemannanın en dikkat çekici biyolojik aktivitelerinden biri, makrofajları aktive etmeleri ve T hücrelerini stimüle etmeleridir. Bu immünstimülatör etkileri aynı zamanda yara iyileşmesini de desteklemektedir [25,38,39].



Şekil 1. Yara iyileştirmede etkili *Aloe vera* jeli bileşenleri

Antioksidan Etkisi

A. vera'nın yaprakları ile çiçekleri antioksidan etki göstermektedir. Yapraklarında bulunan α -tokoferol, karotenoidler, askorbik asit, flavonoidler, tanenler, C, E, B₁ (tiamin), B₂ (riboflavin), B₃

(niasin) vitaminleri, kolin, folik asit, aloesin, aloeresin A, aloeson, aloe-emodin ve bazı polisakkaritlerin antioksidan özelliği olduğu; bitkideki glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzimlerinin de antioksidan aktiviteden sorumlu oldukları belirtilmiştir [40,41].

A. vera, içerdiği bileşenleri sayesinde ortaya koyduğu doğrudan antioksidan etkisinin yanında, vücudun kendi antioksidan enzim sistemlerini de aktive edebilmektedir [40]. Jelin, oral yolla alınmasıyla doza bağımlı olarak gösterdiği antioksidan etkisinin, birçok rahatsızlıkta tedavi edici olarak kullanılmasında önemli rol oynadığı; oksijen radikallerinin oluşumunu engelleyen bu özelliği ile aynı zamanda immünomodülatör etki ortaya koyduğu [20,21] ve immün sistemi aktive etmesinin de aynı zamanda yara iyileştirici özelliğiyle de ilişkili olduğu bildirilmiştir [40,42].

Antienflamatuvar Etkisi

A. vera bileşenlerinden asemannan, bazı polisakkaritler, β -sitosterol, kolesterol, kampesterol, lektin, [aspirin benzeri yapıda olan] salisilik asit, giberellin, aloin, aloeresin A, B, D ve E gibi bazı antrakinin ve kromonlar ile fenolik bileşenler antienflamatuvar etki sergilemektedir [9,25,43–46].

A. vera'nın, prostanoidlerin (siklooksijenaz ürünleri), polimorfonükleer lökosit (granülosit) infiltrasyonunun ve histamin oluşumunun engellenmesi, içerdiği bradikinin enzimiyle bradikinin aktivitesinin inhibe edilmesi [25,43,47], giberellin aktivitesi, mannozdan zengin karbohidratların iltihaplı dokulara nötrofil göçünü [44] ve lökosit adezyonunu engellemesi [33] mekanizmaları ile ödemi azaltarak antienflamatuvar etkinlik gösterdiği düşünülmektedir.

İmmünstimülan Etkisi

İmmün sistemi doğrudan etkileme özelliğine sahip olan *A. vera*'nın immünomodülatör (bağışıklık sistemini düzenleyici) etkinliği, jeldeki mannanlarla; özellikle de asemannanla ilişkilendirilmektedir [25]. Mannanlar, hem hücre yüzeyinde hem de hücre içinde mannanlar için spesifik reseptörlere sahip olduğu bilinen makrofajları aktive eder ve T hücrelerini uyarır [27]. *A. vera*'nın makrofajları aktive edici bu özelliği, aynı zamanda yara iyileşmesini de hızlandırmaktadır. Makrofajları aktive ederek nitrik oksit ve sitokinlerin üretimini uyarır, fagositozu, dolaşımdaki monosit ve makrofaj sayısını, spesifik antikor üretimini artırır, apoptozu (planlı hücre ölümü) uyarır, antienflamatuvar etkinlik gösterir ve bu mekanizmalarla *A. vera* immünomodülatör etkinlik gösterir [9,25,27,44].

Antimikrobiyal Etkisi

A. vera'nın bakteri, virüs ve mantarlara karşı antimikrobiyal etkisinden, hem jel, hem de usaresindeki çeşitli bileşenler sorumludur. Patojenlere yönelik bu etkisini doğrudan veya immün sistem hücrelerini uyararak dolaylı yoldan gerçekleştirmektedir [13,33]. Polisakkaritler, asemannan, aloin, aloe-emodin, saponinler, lupeol, salisilik asit, p-kumarik asit, askorbik asit, pirokatekol, sinamik asit, fenoller ve sülfür, bitkide yer alan antibakteriyel, antifungal ve antiviral ajanlar olarak çeşitli kaynaklarda tanımlanmıştır [38,48,49].

Antitümör Etkisi

Çeşitli laboratuvar ve hayvan çalışmalarında, *A. vera* yaprak bütünüdürün içeriğinde bulunan bileşenler sayesinde doğrudan veya antioksidan ve immünomodülatör etkileri aracılığıyla tümör karşıtı etkinlik gösterdiği belirtilmiştir [50–52]. Yapılan çalışmalarda özellikle aloe-emodin, aloin, lektinler, asemannan ve aloesin bileşenlerinin, *A. vera*’nın antitümör etkinliğinde öne çıkan bileşenler olduğu görülmektedir [47,48]. *A. vera* yaprak bütünüdürdeki bileşenlerin tümör büyümesini engellediği veya tümör boyutunu azalttığı çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda ortaya konmuş olup [53]; yaprak bütünüdürün, bitkiden saflaştırılan bileşenlerin tek başına gösterdiği aktiviteden daha yüksek antitümör etkinlik gösterdiği belirtilmektedir [51,54].

Diğer Etkileri

Bu etkilerinin yanı sıra, *A. vera*’nın karboksipeptidaz enzimi, antrakınonlar ve türevleri, salisilik asit ve steroller sayesinde analjezik (ağrı kesici) [14,22,27,47]; santral ve periferel sinir sisteminde sedatif, hipnotik, periferel analjezik ve antioksidan ve antienflamatuvar özellikleriyle sinir koruyucu [55–57] etkisi olduğu belirtilmiştir. Jel ekstresinin karanlık ortamda 3-10 gün depolanmasıyla açığa çıkan prostanoidler sayesinde antiastmatik etkisi bulunmaktadır [43,47,58]. Bunlara ek olarak, prostoglandin, tiroid, kalsitonin, paratiroid, ve östrojen hormon düzeyleri [9,16,23,59] ile kan basıncı [16] üzerinde de etkisi olduğu çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir.

***Aloe vera* Bitkisinin Terapötik Amaçlı Kullanım Alanları**

A. vera jeli ve yaprak bütünüdürden elde edilen preparatlar, geniş çapta farmakolojik etkileri sayesinde, harici ve dahili olarak geniş kullanım alanına sahiptir. Kullanım alanlarında genellikle birden fazla farmakolojik özelliğinin bir arada terapötik etki gösterdiği düşünülmektedir. *A. vera*’nın terapötik amaçlı kullanım alanları ve kullanılan yaprak bölümleri aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

- a) Konstipasyonda laksatif olarak kullanımı (Usare - Dâhili kullanım)
- b) Yaralarda ve yanıklarda kullanımı (Jel - Harici kullanım)
- c) Cilt rahatsızlıklarında kullanımı (Jel ve yaprak bütünü - Harici kullanım)
- d) Antidiyabetik ve antihiperlipidemik amaçlı kullanımı (Jel ve saflaştırılmış yaprak bütünü - Dâhili kullanım)
- e) Gastrointestinal sistem rahatsızlıklarında kullanımı (Jel - Dâhili kullanım; Yaprak bütünü ve jel - Harici kullanım (hemoroid ve anal fissürde))
- f) Oral mukoza rahatsızlıklarında ve oral hijyen amaçlı kullanımı (Jel ve yaprak bütünü - Harici ve dâhili kullanım)

Konstipasyonda Laksatif Olarak Kullanımı

A. vera’nın oral olarak kabızlıkta kullanımı, bitkinin bilinen en eski kullanım alanıdır [10,24]. Ancak, içeriğinde bulunan antron, antrakınon, serbest antron, diantron gibi hidroksiantrakınon

türevlerinden dolayı kolonu uyarıcı laksatif etkisi bulunan *A. vera* usaresinin, oral olarak kullanımında sağlığa zararlı etkisi olabileceğinden ciddi uyarılar bulunmaktadır. Bu tür laksatiflerin yalnızca kısa süreli konstipasyon durumlarında kullanılabileceği belirtilmekte, kullanım süresinin 1 - 2 haftadan uzun olmaması ve haftada 2-3 kereden fazla kullanılmaması tavsiye edilmektedir [26,60]. Bununla birlikte, usarede bulunan hidroksiantrakinon türevlerinin olası toksik ve kanserojen etkilerinden dolayı, *A. vera* usaresi içeren ürünlerin oral olarak tüketiminin kısıtlandırıldığı ve genel olarak önerilmediği görülmektedir [61,62].

Yanıklarda ve Yaralarda Kullanımı

A. vera jelinin yanıklarda ve çeşitli sebeplerle oluşan yaralarda kullanımıyla ilgili insanlar üzerinde yapılmış birçok klinik çalışma bulunmaktadır. Bu rahatsızlıklarda *A. vera*'nın yara iyileştirici, analjezik, immün sistemi aktive edici, antiinflamatuvar, antibakteriyel ve nemlendirici özelliklerinin bir arada etkinlik gösterdiği düşünülmektedir [63,64].

Yanıklarda ve yaralarda jelin genel olarak yara iyileşme süresini kısalttığı, hasar görmüş deri yüzeyinde epitelizasyon hızını ve iyileşme oranını arttırmakta olduğu belirtilmiştir. Tablo 2'de *A. vera*'nın yara iyileştirme etkisiyle ilgili yapılan klinik çalışmalardan bazılarının verileri verilmiştir.

Cilt Rahatsızlıklarında Kullanımı

Sedef: Harici olarak kullanılan *A. vera* ekstresi veya jelinin insanlardaki sedef hastalığına ve radyasyon kaynaklı dermatitlere etkisinin incelendiği klinik çalışmalarda, *A. vera*'nın iyileştirici etkisinin gözlemlendiği sonuçlar olduğu gibi [70–73]; herhangi bir olumlu etkisinin gözlenmediği sonuçların da [74–77] bulunduğu görülmektedir.

Radyasyon dermatiti: Radyoterapi sonrası epitel doku ve alt katmanlarının zarar görmesi sonucu oluşan bu cilt rahatsızlığında, *A. vera* jelinin dermatit oluşumunu önleyici veya oluşan dermatitleri tedavi edici etkinliğini inceleyen çeşitli klinik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların bazılarında dermatit oluşumunu önlemede ve tedavi edilmesinde *A. vera* jelinin etkili olduğu sonucu bulunurken [72,73,78]; bazılarında anlamlı bir iyileştirici veya koruyucu etkisi bulunamamıştır [76,79–81].

Atopik dermatit: Atopik dermatitte *A. vera* jelinin etkinliğinin inceleyen klinik çalışmaların bazılarında, semptomları azaltıcı ve yatıştırıcı etki gösterebileceği belirtilmiştir [82].

Akne vulgaris: Kızarıklık, akne yoğunluğu ve lezyon miktarının azaltılmasında topikal olarak kullanılan jelin olumlu etkisi olduğunu gösteren klinik çalışmalar bulunmaktadır [83,84].

Genital herpes: Genital herpes üzerinde yapılan iki farklı klinik çalışmada, *A. vera* ekstresi (% 0,5) içeren kremin iyileştirici etkisi olduğu rapor edilmiştir [85,86].

İnflamatuvar deri rahatsızlıkları: Seboreik dermatitte [87] ve bebeklerle çocuklarda yaygın olarak görülen bebek bezi dermatitinde [88,89] *A. vera* ekstresi ve jelinin olumlu etkisinin görüldüğü bildirilmiştir.

Tablo 2. *A. vera*'nın yara iyileştirme etkisiyle ilgili yapılan bazı klinik çalışmalar

Materyal	Araştırma tasarımı	Bulgular	Kaynak
<i>A. vera</i> jel	Dişabetik ayak ülseri/ randomize, çift kör klinik araştırma 40 kişi (n:20 deney, n:20 kontrol grubu). Rutin tedaviye ek 4 hafta boyunca günde 2 kere deney grubuna <i>A. vera</i> jel (AVJ), kontrol grubuna plasebo jel uygulanmıştır.	Sonuç olarak iki grup arasında Total Ülser Skoru arasında anlamlı fark olduğu, AVJ kullanılan deney grubunda ülser yüzeyinin daha çok küçüldüğü; ancak yara derinliğinde iki grup arasında anlamlı fark olmadığı gözlenmiştir.	[65]
<i>A. vera</i> jel	Yanık/ Olgu raporu 17 yaşında kadın, %30-40 2. derece yanık ve bundan kaynaklı kronik ülserleşmiş yaralar (uygulama öncesi 40 gün klinikte yatmış) Yanık bölgelerine 21 gün boyunca 12 saatte bir topikal olarak <i>A. vera</i> jel (AVJ) ile hazırlanan karışım uygulanmıştır.	Uzun süredir iyileşmeyen yanık yaraları bulunan hastada, AVJ uygulaması sonrasında deri kızarıklığı ve yara sekresyonlarında azalma gözlenmiş ve 21 gün boyunca yanık bölgelerde enfeksiyon oluşmamıştır. AVJ öncesi döneme göre yara iyileşmesinin daha hızlı olduğu belirtilmiştir.	[66]
<i>A. vera</i> jel	Kronik yaralar/ kontrollü klinik araştırma 60 kişi (n:30 deney, n:30 kontrol grubu). Kontrol grubuna sadece konvansiyonel tedavi, deney grubuna buna ek olarak günde 2 kez <i>A. vera</i> jel (AVJ) uygulanmıştır. 3 ay boyunca takip edilmiştir.	3 ayın sonunda AVJ ve kontrol grubunda sırasıyla iyileşme oranı % 93,3 ve % 46,7; hastanede yatış süresi 35.2±6.4 ve 67.4±8.9 gün; yara iyileşmesi için geçen süre 31.25±11.2 ve 63.2±20.4 gün olarak bulunmuştur.	[67]
<i>A. vera</i> + zeytinyağı kremi (yaprak bölümü bilgisi verilmiştir)	Kronik yaralar/ randomize, çift kör, kontrollü klinik araştırma 60 kişi (n:30 deney, n:30 kontrol grubu). 30 gün boyunca deney grubuna <i>A. vera</i> + zeytinyağı (AVZY) kremi, kontrol grubuna standart uygulama fenitoin merhem uygulanmıştır.	30 gün sonunda yara büyüklüğü, derinliği, sınırları; nekrotik hücre tipi ve oranı; sızıntı tipi ve oranı; yara bölgesi rengi, periferik doku ödem skoru değerlendirilmiştir. Yara iyileşmesi her iki grupta da gelişim gösterirken, değerlendirme parametrelerinde AVZY kremin daha etkili olduğu bildirilmiştir.	[68]
<i>A. vera</i> jel	Sezaryen yaraları/ randomize, çift kör, kontrollü klinik araştırma 90 kişi (n:45 deney, n:45 kontrol grubu). Sezaryen sonrası 8 gün boyunca kontrol grubuna normal pansuman, deney grubuna <i>A. vera</i> jel (AVJ) ile pansuman uygulanmıştır. Ağrı ve yara iyileşmesi takip edilmiştir.	AVJ uygulamasının yan etkisi gözlenmemiştir. 8 günün sonunda iki grubun yara iyileşme skoru arasında anlamlı fark olmadığı ancak AVJ grubunda ilk 24 saatteki yara iyileşme hızının, kontrol grubundan daha yüksek olduğu bulunmuştur.	[69]

Antidiyabetik ve Antihiperlipidemik Amaçlı Kullanımı

Çeşitli klinik çalışmalarda edinilen bulgulara göre, oral yolla alınan *A. vera* jeli veya saflaştırılmış (içeriğindeki antrakinonları uzaklaştırılmış) yaprak bütünü, açlık kan şekeri, hemoglobin A1c (HbA1c), trigliserit, total kolesterol ve LDL kolesterol düzeylerinin düşmesini ve HDL kolesterol düzeyinin yükselmesini sağlayabilmektedir [90]. Obeziteden kaynaklanan metabolik değişimlere karşı koruyucu etkisi ve antioksidan aktivitesi ile *A. vera* jelinin, adipoz yağ birikimini azalttığı ve ağırlık kaybını sağladığı yapılan çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur [91].

Ancak, *A. vera* jelinin lipid ve glukoz metabolizmasında anlamlı değişikliklere yol açmadığını rapor eden çalışmalar da mevcuttur [92,93]. Jelin antidiyabetik veya antihiperlipidemik etki göstermemekle birlikte, tam tersi, kan şekerini yükseltici etki gösterebildiğini bildiren; bunun sebebinin jelin içeriğindeki şekerlerden dolayı olduğunu ileri süren çalışmalar bulunmaktadır [46,94,95]. Tablo

3'te *A. vera*'nın metabolik sisteme etkisi üzerine son yıllarda yapılmış klinik çalışmalardan bazılarında özet olarak yer verilmiştir.

Gastrointestinal Sistem Rahatsızlıklarında Kullanımı

Gastrik ülser: Fareler üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda, *A. vera* jelinin asitle indüklenen gastrik ülser lezyonlarını azalttığı [96]; jelin alımıyla midedeki asit sekresyonunun, mide sıvısındaki protein ve karbonhidratların azaldığı ve bu yolla ülser karşıtı mide koruyucu etki gösterdiği [97], yaprak bütününe sulu ekstresinin farelerde gastrik asit sekresyonunu azalttığı [98] rapor edilmiştir.

Gastroözofageal reflü (GÖR): 79 hasta ile yürütülen randomize, kontrollü bir klinik çalışmada, hastalar üç gruba ayrılarak iki gruba standart tedavide kullanılan iki farklı ilaç tedavisi uygulanırken, diğer gruba standardize edilmiş (5 mg polisakkarit/mL) *A. vera* jel içeren şuruptan günde bir kez 10 mL verilmiştir. Dört hafta boyunca devam eden tedavi sonunda, jelin iyi bir şekilde tolere edildiği ve yalnızca iki kişide yan etki (mide ağrısı ve vertigo) görüldüğü; *A. vera* jelinin GÖR semptomlarını, standart tedavide kullanılan ilaçlarla kıyaslanabilir düzeyde azalttığı belirtilmiştir [99].

İrritabl bağırsak sendromu (İBS): *A. vera*'nın İBS'de etkinliği üzerine yapılmış randomize kontrollü klinik çalışmaları inceleyen bir sistematik derlemede, *A. vera*'nın İBS'de plasebo tedavisine göre daha etkin olduğu ve kısa süreli oral kullanıma uygun olduğu sonucuna varılmıştır [100].

Ülseratif kolit: Hafif-orta şiddetli ülseratif koliti olan 44 hasta ile yürütülen randomize, çift kör, plasebo kontrollü bir klinik çalışmada, *A. vera* jel tüketen grupta, plasebo grubuna oranla ülseratif kolit ve histolojik skorlarında anlamlı düşüş olduğu, daha olumlu bir klinik yanıt alındığı gözlenmiştir [101].

Anal fissür: Prospektif, çift kör bir klinik çalışmada yaşları 20-70 arasında değişen 60 kişilik hasta grubunda, *A. vera* jeli içeren krem uygulananlarda, kontrol grubuna göre ağrı hissinde ve hemorajide anlamlı ölçüde azalma olduğu ve yara iyileşmesinde anlamlı gelişme olduğu rapor edilmiştir [102].

Ağız Sağlığında Kullanımı

Çeşitli çalışmalarda *A. vera*'nın antienflamatuvar ve immünomodülatör etkileriyle ağız içinde oluşan çeşitli enflamatuvar hastalıklarda; antienflamatuvar, yara iyileştirici ve immünomodülatör etkileriyle radyasyon tedavisinin yan etkilerinden olan ağız içi mukozasında oluşan yaralarda ve antibakteriyel etkisiyle ağız içi hijyeninin sağlanmasında etkinlik gösterdiği ortaya konmuştur [107,108].

Son Yıllarda Öne Çıkan Kullanım Alanları

Gelişen teknolojiyle birlikte bitkinin kullanım alanları da genişlemektedir [46]. Son yıllarda doku mühendisliği, rejeneratif tıp ve biyomedikal alanlarında yapılan çalışmalarda, hücre yenilenmesini, hücre çoğalmasını, anjiyojenez ve yara iyileşmesini destekleyen özellikleri sebebiyle *A. vera* jeli,

laboratuvar ortamında hücre oluşturmada kullanılan doku iskelelerinin yapısına katılmaya başlanmış ve hücre çoğalmasında etkili sonuçlar alınmıştır [109].

A. vera jeli gibi antienflamatuvar, antimikrobiyal ve hücre yenileyici bileşenler içeren doğal kaynaklı materyallerin, nano fiber yapılı dokularda kullanılarak hem yara iyileşmesini destekleyen, hem de yara alanında oluşabilecek enfeksiyonları önlemede etkili olan pansuman ve yara örtüsü malzemelerinin üretildiği görülmektedir [110]. Benzer amaçla, yaralı bölgeye uygulanmak üzere hazırlanan *A. vera* jel içeren polimerik filmlerin de, yara iyileşmesini desteklediği ortaya konmuştur [111].

Yine son yıllarda yapılan çalışmalarda; *A. vera* jelinin mikroenkapsülasyon yöntemi ile kıyafetlere tatbik edilerek, jelin antiseptik, antibakteriyel, antifungal ve yara iyileştirici özellikleri sayesinde çeşitli cilt rahatsızlıklarında iyileşmeye yardımcı kıyafetler üretildiği [112]; jel ekstresinin kitre zamkıyla kaplanması sonucu nanokapsüllerin elde edilerek, yara bölgelerinde topikal olarak kullanımı güvenli, antimikrobiyal ve yara iyileşmesini destekleyici ürünler ortaya çıkarıldığı görülmektedir [113]. Benzer şekilde, nanoteknoloji kullanılarak bir araya getirilen *A. vera* yaprak bütünü ekstresi ve gümüş nanopartiküllerden oldukça etkili bir antibakteriyel nanomateryal elde edildiği belirtilmektedir [114].

Kullanılmaması Gereken Durumlar, İlaç Etkileşimleri, İstenmeyen Yan Etkileri ve Toksisitesi

Kullanılmaması Gereken Durumlar

A. vera usaresinin hamilelik, emzirme dönemi, 12 yaşından küçük çocuklar, duyarlılığı olanlar, bağırsak tıkanıklığı ve darlığı, atoni, apandisit, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, sebebi bilinmeyen abdominal ağrı, su ve elektrolit kaybıyla seyreden ishal durumlarında kullanılmaması gerektiği belirtilmiştir. Antrakinon laksatiflerinin fazla miktarda ve uzun süreli tüketimi, ishale, su ve elektrolit (özellikle potasyum) kayıplarına ve bu yolla hipokalemiye yol açabilmektedir [7, 11, 26, 60]. Jelin oral olarak hamilelikte ve emzirme döneminde kullanımı ile ilgili yapılan klinik çalışma bulunmamakla birlikte, kullanımı önerilmemektedir [115]. Oral olarak *A. vera* kullanımı, ameliyat sırasında kanamayı arttırabileceğinden, ameliyatın en az 2 hafta öncesinden kullanımının bırakılması [47] ve bilinen alerji durumunda dâhilen veya haricen kullanılmaması gerektiği belirtilmiştir [14].

İlaç Etkileşimleri

A. vera usaresinin uzun süre kullanılması nedeniyle oluşabilecek potasyum eksikliği durumunda kardiyak glikozitlerle birlikte alınmasının, hipokalemiden kaynaklı aritmiye sebep olabileceği ve diğer istenmeyen etkiler doğurabileceği belirtilmiştir [38,49,115]. *A. vera* jeli hipoglisemik etki gösterdiğinden, jelin insülin ve oral antidiyabetiklerle beraber kullanıldığında hipogliseminin artmasına yol açabildiği [14,116], jelin oral yolla tüketilmesinin düşük biyoyararlanımı olan bazı ilaçların emilimini artırma potansiyeli olduğu [47] belirtilmiştir. *A. vera* jelin topikal olarak uygulanmasının, hidrokortizon gibi steroid kremlerin etkinliğini arttırabildiği bildirilmektedir. Antidiyabetik, diüretik,

laksatif etkili ilaçlarla birlikte veya sevofluran ya da digoksin kullanılan durumlarda, jelin düzenli olarak uygulanması tavsiye edilmemektedir [14].

Tablo 3. *Aloe vera*'nın metabolik sisteme etkisi üzerine son yıllarda yapılmış klinik çalışmalar

Materyal	Araştırma tasarımı	Bulgular	Kaynak
300 mg veya 500 mg standardize <i>A. vera</i> jel ekstresi kapsülü	Çift kör, randomize klinik çalışma 72 prediyabetik hasta üç gruba bölünerek 8 hafta boyunca günde 2 kere tok karına 300 mg veya 500 mg <i>A. vera</i> kapsül veya plasebo kapsül verilmiştir. Hastaların kan şekeri ve lipid profili değerlendirilmiştir.	Açlık kan şekeri (AKŞ) ve HbA1c, 4. hafta sonunda her iki <i>A. vera</i> grubunda azalırken, kontrol grubunda anlamlı bir değişiklik olmamıştır. 500 mg kapsül grubunda 4. hafta sonunda TG ve 8. hafta sonunda toplam kolesterol ve LDL'de anlamlı düşüş; HDL'de anlamlı artış olmuştur. Herhangi bir yan etki görülmediği bildirilmiştir.	[103]
1000 mg standardize <i>A. vera</i> yaprak ekstresi tableti	Çift kör, randomize klinik çalışma En az 6 aydır tip 2 diyabet tanılı 44 hasta iki gruba bölünerek 2 ay boyunca günde 1000 mg <i>A. vera</i> ekstresi tableti veya plasebo tablet verilmiştir. Hastaların kan şekeri ve lipid profili değerlendirilmiştir.	<i>A. vera</i> grubundaki diyabet hastalarının 2 aylık kullanım sonrası açlık kan şekeri, HbA1c, toplam kolesterol, TG, HDL ve LDL değerlerinde anlamlı fark bulunmamıştır. Ayrıca her iki gruptaki hastaların kan şekeri ve lipid profili arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Yan etki bilgisi verilmemiştir.	[104]
700 mg standardize <i>A. vera</i> yumuşak kapsül	Randomize klinik çalışma Prediyabetik ve tedaviye başlanmamış diyabetli 136 hasta iki gruba bölünmüştür. Deney grubu 8 hafta boyunca günde 2 kere <i>A. vera</i> kapsül, kontrol grubu ise plasebo kapsül tüketmiştir. Hastalarda obezite ve diyabetle ilgili metabolik değişimler incelenmiştir.	Çalışmanın sonunda <i>A. vera</i> grubunda vücut ağırlığı ve vücut yağ kütesinde anlamlı azalma olduğu, insülin duyarlılığının anlamlı olarak arttığı; kontrol grubunda ise bu parametrelerde herhangi bir değişim olmadığı rapor edilmiştir. Ancak iki grupta açlık kan şekeri ve HbA1c düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bir advers etki görüldüğü bildirilmiştir.	[92]
300 mg saflaştırılmış standardize <i>A. vera</i> jeli kapsülü	Çift kör, randomize klinik çalışma 67 tip 2 diyabet hastası iki gruba bölünmüştür. Deney grubuna 2 ay boyunca oral yolla günde 2 adet 300 mg <i>A. vera</i> jel kapsülü; kontrol grubuna ise aynı ölçüde plasebo kapsül verilmiştir. Kan şekeri ve lipid profili parametreleri incelenmiştir.	<i>A. vera</i> grubunda glikoz, HbA1c, toplam kolesterol ve LDL değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulunduğu belirtilmiştir. Herhangi bir yan etki görülmediği bildirilmiştir.	[105]
<i>A. vera</i> jelinden saflaştırılan yüksek molekül ağırlıklı bileşenlerden (polisakkaritler, verektin ve < 10 ppm barbaloin) oluşan sıvı içecek	Klinik çalışma Tip 2 diyabetli ve ilaç tedavisi gören 15 hastaya, tedavilerinin yanında 12 hafta boyunca oral yolla günde 3 kere 0,05 g sıvı içecek verilmiştir. Açlık kan şekeri (AKŞ), HbA1c, TG, kolesterol, AST, ALT ve serum kreatinin düzeyleri incelenmiştir.	Yüksek molekül ağırlıklı bileşenlerden oluşan sıvının tüketimiyle 12 haftanın sonunda, tamamı fazla kilolu olan hastaların başlangıca göre AKŞ değerinde % 32; TG değerinde % 35; HbA1c değerinde % 20 düşüş gözlenmiştir. Kolesterol, AST, ALT ve serum kreatinininde ise anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. Herhangi bir yan etki görülmediği bildirilmiştir.	[106]

İstenmeyen Yan Etkileri

A. vera usaresinin dâhili kullanımı ile ilgili, usarenin içeriğindeki aloin A ve aloin B gibi antrakinon metabolitlerinin sebep olduğu düşünülen abdominal ağrı ve spazm görülebildiği; hamilelikte kullanımında ise uterus kaslarının kasılmasını uyarabileceği belirtilmiştir [115]. Oral yolla iki hafta ila yaklaşık bir yıl boyunca çeşitli *A. vera* ürünlerinin kullanımı sonrasında akut hepatit ve karaciğer

fonksiyon bozukluğu gelişen; T₃ ve T₄ tiroid hormonlarının seviyesi düşen; hipokalemi ortaya çıkan; sarılık, halsizlik, bitkinlik, üst abdomen rahatsızlığı, deri kaşıntısı, bulantı ve kusma şikayetleri ile sağlık kuruluşuna başvuran birbirinden farklı olgular rapor edilmiştir [117-121]. Jelin harici kullanımının ise genellikle iyi tolere edildiği bildirilmiş; ancak, bazı olgularda yanma, kısa süreli ağrı hissi, hafif derecede iritasyon, hafif kaşıntı ve kontakt dermatit, alerjik reaksiyon ve kontakt ürtiker rapor edilmiştir [11, 115, 122].

Toksisitesi

A. vera bitkisinin toksisitesi ile ilgili hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, *A. vera* usaresi ve yaprak bütünü, içerdikleri aloin A ve B ile aloe-emodin gibi hidroksiantrakinon bileşiklerinden kaynaklandığı düşünülen kanserojen ve genotoksik etkileri olduğu ve bu sebeple insanlar için oral yolla tüketiminin toksik ve kanserojen etkiler yaratabileceği kanaatine varılmıştır. Nitekim, ülkemizde ve dünyada konu ile ilgili resmi kurumlar tarafından yapılan düzenlemelerde, *A. vera* usaresinin ve usare bileşenlerini ihtiva eden yaprak bütünü ürünlerinin oral olarak tüketiminin kısıtlandırıldığı veya genellikle önerilmediği görülmektedir. Antrakinon bileşenleri uzaklaştırılmış olan *A. vera* yaprak ürünleriyle ilgili yürütülen toksikolojik çalışmaların genelinde, dâhili ve harici kullanımın toksik veya kanserojen etki gösterdiğine dair herhangi bir bulguya rastlanmadığı sonucuna varılmıştır [10,61,62,123].

***Aloe vera* Bitkisinden Elde Edilen Preparatlar ve Kullanımıyla İlgili Yasal Düzenlemeler**

A. vera yapraklarının bütünü, usaresi veya jeli; ezme, öğütme, filtrasyon, dekolorizasyon/saflaştırma/renksizleştirme (usaredeki laksatif özellikte olan antrakinonları ve bunlardan kaynaklanan acımsı tat ile yeşilimsi rengi uzaklaştırmak için aktif karbonla uygulanan bir işlem), stabilizasyon, ısı işlem gibi çeşitli aşamalardan geçirilerek tablet, toz veya sıvı formda dâhili veya harici kullanıma uygun çeşitli ürünler elde edilmektedir. Bu ürünler arasında en güvenilir olan kullanım şeklinin, jelin harici kullanımı olduğu kabul edilmektedir [10,61]. Bitkinin farklı kısımlarından farklı işlemler sonucu elde edilen ürünlerle ilgili ülkemizde ve dünyada devlet otoriteleri ve *Aloe vera* ürünlerinin sahip olması gereken kalite standartlarını ve analizlerle ilgili parametreleri belirleyerek ürünleri buna göre onaylayan kâr amacı gütmeyen bir organizasyon olan IASC (International Aloe Science Council) tarafından kabul edilen çeşitli düzenlemeler bulunmaktadır. Bu düzenlemeleri özetlemek gerekirse;

- Ülkemizde de T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü tarafından hazırlanan “***Aloe vera* (L.) Burm. f.’nin Yapraklarından Elde Edilen *Aloe vera* Jel ve Renksizleştirilmiş Yaprak Usaresi’nin Gıdalarda Kullanımının Güvenilirliğinin Değerlendirilmesi Hakkında Bilimsel Görüş**” raporunda, oral tüketim ürünleri olarak yalnızca saflaştırılmış *A. vera* yaprak bütünü ile *A. vera* jelinden elde edilen ürünler değerlendirmeye alınmıştır. Yapılan değerlendirmede, bu ürünlerin gıdalarda kullanımı için “*gıdalarda*

kullanılabileceği, ancak bunları içeren ürünlerde aloin miktarının sınırlandırılması ve belirli tüketici grupları için uyarılara yer verilmesi gerektiği”, son ürünlerdeki toplam antrakinon oranının IASC tarafından belirlenmiş sınır olan 10 ppm’i aşmaması gerektiği ve ürünlerin üzerinde “Hamileler, emzirenler ve 12 yaşın altındaki çocuklar tarafından tüketilmemelidir. İlaç kullanan bireyler, tüketmeden önce doktora danışmalıdır” uyarısının bulunması koşulu ile pozitif (P) olarak belirlenmesi yönünde tavsiye kararı alınmıştır [61].

- IASC tarafından yalnızca saflaştırılmış *A. vera* yaprak bütünü ve *A. vera* jeli ürünleri oral tüketime uygun olarak kabul edilmiş ve içeriklerindeki aloin, asetile mannanlar vb. bileşenler için insan sağlığına en uygun olacak şekilde alt veya üst limitler belirlenmiştir. Ayrıca ürünün yaprağın hangi bölümünden elde edildiği bilgisinin ve yaprağa uygulanan işlemlerin ürün etiketinde belirtilmesi koşulu getirilmiştir. [124, 125].
- Amerika’da FDA (Food and Drug Administration) yasal bir düzenlemeye giderek, *A. vera* usaresini ve usarede bulunan laksatif bileşenler olan aloe-emodin ve barbaloin (aloin) içeren laksatif ürünleri, stimülan oral laksatif ilaç olarak değerlendirmiş ve bu ilaçların kullanılmasına kısıtlama getirerek, ürünlerin içeriklerinin değiştirilmesine ya da piyasada satışlarının durdurulmasına karar vermiştir [62]. Amerika Sağlık Bakanlığı’na bağlı resmi kurumlardan olan “The National Center for Complementary and Integrative Health (NCCIH)” tarafından yayımlanan bilgilendirme notunda, jelin topikal kullanımının güvenilir görüldüğü belirtilmiş; ancak diğer yaprak ürünlerinin oral tüketiminin bazı yan etki ve ilaç etkileşimleri olabileğinden dikkat edilmesi uyarısında bulunulmuştur [126].
- Avrupa’da EFSA (European Food Safety Authority) tarafından usaredeki hidroksiantrazen türevlerinden dolayı kullanımında dikkat edilmesi uyarısında bulunulmuş [127]; EMA (European Medicines Agency), usarenin kontrendikasyonlara ve uyarılara dikkat edilerek, mümkün olan en az dozda, kısa süreli kabızlıkta kullanılabileceğini belirtmiştir [128]. Avrupa Komisyonu tarafından hazırlanan gıda katkı maddeleri kodeksinde *A. vera*, kodekste belirlenen güvenilir miktar sınırları dâhilinde kullanılabilecek katkı maddelerinden biri olarak yer almaktadır [129].
- Diğer dünya ülkelerinde de genellikle antrakinon (aloin, aloe-emodin) miktarının sınırlandırılması koşuluyla, saflaştırılmış yaprak bütünü ve jelden elde edilen ürünlerin haricen ve gıda olarak kullanımına izin verildiği görülmektedir [61].

SONUÇ VE TARTIŞMA

A. vera’nın geniş kimyasal bileşen içeriği olduğu ve bitkiden saflaştırılan bu bileşenlerle ilişkilendirilen biyolojik aktiviteler bulunduğu bilirse de; genel olarak varılan yargı, bitki bütününe çoğu farmakolojik etkinlikte, saflaştırılan bileşenlerin tek başına gösterdiği aktiviteden daha güçlü

olduğu ve bitkide yer alan bileşenlerin hep birlikte sinerjik etki gösterdiği yönündedir [9,23,130]. Yaprak bütününe daha güçlü olduğu farmakolojik etkiler arasında, yara iyileştirici etki ve laksatif etki birer istisna olarak görülmektedir. Öyle ki; jelin iyileştirici etkisinin, yaprak bütününe kıyasla daha yüksek olduğu [131] ve laksatif etkinin de, içerdiği antrakinin bileşenlerin yoğunluğundan dolayı usarede daha güçlü olduğu bilinmektedir.

Çeşitli *A. vera* ürünleri hem ülkemizde, hem de dünya çapında farklı rahatsızlıklarda iyileştirici veya sağlığın korunması gibi amaçlarla dâhilen veya haricen kullanılmaktadır. *A. vera*'nın kullanılan yaprak bölümüne (usare, jel veya yaprak bütünü) ve yaprak bölümünün işlenmesinde kullanılan tekniğe göre, kimyasal kompozisyonu ve kullanım alanları birbirinden farklı olan ürünler elde edilmektedir. Bu bitkisel ürünlerin ilgili otoriteler tarafından belirlenen kriterlere uygun olarak üretilmesi, güvenilirlik değerlendirmesi açısından belirleyici niteliktedir. Ancak bu aşamada, kalite sertifikasına sahip olsa da ürünlerin depolama sürecinde içeriğinde kayıplar olabileceği yapılan bazı çalışmalarla ortaya konmuştur [13]. Bu sebeple, ürünlerin çeşitli amaçlarla oral yolla alınmasının, gerek ilaç etkileşimleri ve oluşabilecek yan etkiler, gerekse üretim ve işleme aşamalarında antrakinin bileşen içeriğinin giderilmemesi gibi riskler, literatürde birçok bilimsel çalışmada üzerinde durulmuş olan hususlardandır.

A. vera'nın yara iyileşmesini destekleyici, antienflamatuvar ve antimikrobiyal etkilerinin, gelişen teknoloji ile birlikte daha geniş uygulama alanlarına ışık tuttuğu görülmektedir. Özellikle jelin, nanoteknoloji ve diğer ileri yöntemler kullanılarak yara pansuman malzemelerinin, kumaşların, antibakteriyel ürünlerin, oral sağlık ürünleri ve kişisel bakım malzemelerinin içeriğine eklenmesi, bitkinin bu terapötik özelliklerinden faydalanabileceğimiz daha geniş kullanım alanları yaratmaktadır. Endüstri alanındaki gelişmelerin takip edilerek, bitkinin tedavi edici niteliklerinden en üst seviyede yararlanabileceğimiz, etkili, güvenli ve doğal içerikli ürünlerin geliştirilmesi için multidisipliner çalışmaların yürütülmesi gerekmektedir. Bitkinin birçok farmakolojik etkisi olduğu bilinse de, henüz birçoğunun mekanizması tam anlamıyla açıklanamamaktadır. *A. vera*'nın çeşitli rahatsızlıklarda etkisiyle ilgili yeterli sayıda klinik çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte, klinik çalışmalarda kullanılan ürünlerin ticari hazır ürünler ya da taze yapraktan hazırlanan ürünler olmasının da sonuçları etkilediği düşünülmekte [132] ve birbiriyle çelişkili sonuçların alındığı görülmektedir. Bitkinin çeşitli rahatsızlıklardaki etki mekanizmalarının, olası yan etkilerinin, işlenmiş *A. vera* ürünlerinin etkinliğinin ve kullanım güvenliği konularının tam olarak anlaşılabilmesi için, bu konularda daha çok bilimsel çalışmanın yapılmasına ve kullanıma sunulan bitkisel ürünlerle ilgili daha geniş kapsamda yasal düzenlemelerin getirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

YAZAR KATKILARI

Kavram: H.A.T., G.İ.K.; Tasarım: H.A.T., G.İ.K.; Denetim: H.A.T., G.İ.K.; Kaynaklar: H.A.T., G.İ.K.; Veri toplama ve/veya işleme: H.A.T., G.İ.K.; Analiz ve/veya yorumlama: H.A.T., G.İ.K.; Literatür taraması: H.A.T., G.İ.K.; Makalenin yazılması: H.A.T., G.İ.K.; Kritik inceleme: H.A.T., G.İ.K.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

1. Kumar, S., Purohit, C.S., Kulloli, R.N. (2020). *Aloe trinervis* sp. nov.: A new succulent species from Indian Desert (Asphodelaceae). *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*, 13, 325-330. [Crossref]
2. Chase, M.W., De Bruijn, A.Y., Cox, A.V., Reeves, G., Rudall, P.J., Johnson, M.A.T., Eguiarte, L.E. (2000). Phylogenetics of Asphodelaceae (Asparagales): An analysis of plastid rbcL and trnL-F DNA sequences. *Annals of Botany*, 86(5), 935-951. [Crossref]
3. Foster, M., Hunter, D., Samman, S. (2011). Evaluation of the Nutritional and Metabolic Effects of *Aloe vera*. In: Benzie I.F.F. and Wachtel-Galor S. (Eds), *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects* (pp. 37-54). Boca Raton: CRC Press.
4. Mahor, G., Ali, S.A. (2016). Recent update on the medicinal properties and use of *Aloe vera* in the treatment of various ailments. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 9(2), 273-288.
5. Davis, P. (1984). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol. 8, (pp. 355-356). Edinburgh: Edinburgh University Press.
6. Upton, R., Axentiev, P., Swisher, D. (2012). *Aloe vera* Leaf, *Aloe vera* Leaf Juice, *Aloe vera* Inner Leaf Juice. In: Upton R. (Ed), *American Herbal Pharmacopoeia*, (pp. 1-52). California.
7. Gruenwald, J., Brendler, T., Jaenicke, C. (2000). *Aloe vera*. In: Fleming T. (Ed). *Physician's Desk Reference (PDR) for Herbal Medicines: Herbal Monographs*, (pp. 16-20). Montvale, New Jersey; Medical Economics Company.
8. Zeybek, U., Haksel, M. (2011). Türkiye’de ve Dünyada Önemli Tıbbi Bitkiler ve Kullanımları, ARGEFAR&Helvacızade Sağlık Yayınları, (pp.167-172). İzmir.
9. Baruah A, Bordoloi M, Deka Baruah HP. (2016). *Aloe vera*: A multipurpose industrial crop. *Industrial Crops and Products*, 94, 951-963. [Crossref]
10. IARC Monographs (Online) (2015). International Agency for Research on Cancer (IARC), Vol. 108, (pp. 37-71). Lyon. [www.monographs.iarc]

11. World Health Organization (WHO) (1999). WHO Monographs on Selected Medicinal Plants (Vol. 1). In: WHO Monographs on Selected Medical Plants. World Health Organization: Geneva, Switzerland, (pp. 33–49).
12. Femenia, A., Sanchez, E.S., Simal, S., Rossello, C. (1999). Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. *Carbohydrate Polymers*, 39, 109–117. [\[Crossref\]](#)
13. Boudreau, M.D., Beland, F.A. (2006). An evaluation of the biological and toxicological properties of *Aloe Barbadensis* (Miller), *Aloe Vera*. *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 24, 103–154. [\[Crossref\]](#)
14. Bhuvana, K.B., Hema, N.G., Patil, R.T. (2014). Review on *Aloe vera*. *International Journal of Advanced Research*, 2(3), 677–691.
15. Boudreau, M.D., Mellick, P.W., Olson, G.R., Felton, R.P., Thorn, B.T., Beland, F.A. (2013). Clear evidence of carcinogenic activity by a whole-leaf extract of *Aloe barbadensis* Miller (*Aloe vera*) in F344/N rats. *Toxicological Sciences*, 131(1), 26–39. [\[Crossref\]](#)
16. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel (2007). Final Report on the Safety Assessment of *Aloe andongensis* Extract, *Aloe andongensis* Leaf Juice, *Aloe arborescens* Leaf Extract, *Aloe arborescens* Leaf Juice, *Aloe arborescens* Leaf Protoplasts, *Aloe barbadensis* Flower Extract, *Aloe barbadensis* Leaf, *Aloe bar.* *International Journal of Toxicology*, 26(2), 1–50. [\[Crossref\]](#)
17. Waller, G.R., Mangiafico, S., Ritchey, C.R. (1978). A chemical investigation of *Aloe barbadensis* Miller. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, 58, 69–76.
18. Raksha, B., Pooja, S., Babu, S. (2014). Bioactive compounds and medicinal properties of *Aloe vera* L.: An update. *Journal of Plant Sciences*, 2(3), 102–107. [\[Crossref\]](#)
19. López, A., De Tangil, M.S., Vega-Orellana, O., Ramírez, A.S., Rico, M. (2013). Phenolic constituents, antioxidant and preliminary antimycoplasmic activities of leaf skin and flowers of *Aloe vera* (L.) Burm. f. (syn. *A. barbadensis* Mill.) from the Canary Islands (Spain). *Molecules*, 18, 4942–4954. [\[Crossref\]](#)
20. Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64, 3–19. [\[Crossref\]](#)
21. Hamman, J.H. (2008). Composition and applications of *Aloe vera* leaf gel. *Molecules*, 13(8), 1599–1616. [\[Crossref\]](#)
22. Ahlawat, K.S., Khatkar, B.S. (2011). Processing, food applications and safety of *Aloe vera* products: A review. *Journal of food science and technology*, 48(5), 525–533. [\[Crossref\]](#)
23. Rodríguez, E.R., Martín, J.D., Romero, C.D. (2010). *Aloe vera* as a Functional Ingredient in Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 305–326. [\[Crossref\]](#)
24. Brusick, D., Mengers, U. (1997). Assessment of the genotoxic risk from laxative senna products. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 29(1), 1–9. [\[Crossref\]](#)
25. Mascolo, N., Izzo, A.A., Borrelli, F., Capasso, R., Di Carlo, G., Sautebin, L., Capasso, F. (2004). Healing Powers of Aloes. In: Reynolds T. (Ed), *Aloes: The Genus Aloe* (e-Book), (pp. 222–251).

Boca Raton: CRC Press.

26. European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP). (2014). *Aloe barbadensis* (Barbados Aloes). In: Mills S, Hutchins R, (Eds), ESCOP Monographs. Exeter, UK: ESCOP.
27. Motykie, G.D., Obeng, M.K., Heggers, J.P. (2004). *Aloe vera* in wound healing. In: Reynolds T. (Ed), Aloes: The Genus Aloe (e-Book), (pp. 252–263). Boca Raton: CRC Press.
28. Sung, C.K. (2006). The History of Aloe. In: Park Y.I., Lee S.K. (Eds). New Perspectives on Aloe (e-Book), (pp. 7–9). New York: Springer.
29. Georgescu, M., Marinas, O., Popa, M., Stan, T., Lazar, V., Bertesteanu, S.V., Chifiriuc, M. (2016). Natural Compounds for Wound Healing. In: Worldwide Wound Healing - Innovation in Natural and Conventional Methods. (pp. 61–89).
30. Ross, I.A. (2001). Medicinal Plants of the World: Chemical constituents, traditional and modern medicinal uses. Vol. 3 (e-Book). Humana Press.
31. Hormozi, M., Assaei, R., Boroujeni, M.B. (2017). The effect of *Aloe vera* on the expression of wound healing factors (TGF β 1 and bFGF) in mouse embryonic fibroblast cell: In vitro study. *Biomedicine&Pharmacotherapy*, 88, 610–616. [\[Crossref\]](#)
32. Subramanian, S., Sathish Kumar, D., Arulselvan P. (2006). Wound healing potential of *Aloe vera* leaf gel studied in experimental rabbits. *Asian Journal of Biochemistry*, 1(2), 178–185. [\[Crossref\]](#)
33. Sánchez-Machado, D.I., López-Cervantes, J., Sendón, R., Sanches-Silva, A. (2017). *Aloe vera*: Ancient knowledge with new frontiers. *Trends in Food Science&Technology*, 61, 94–102. [\[Crossref\]](#)
34. Fox, L.T., Mazumder, A., Dwivedi, A., Gerber, M., du Plessis, J., Hamman, J.H. (2017). In vitro wound healing and cytotoxic activity of the gel and whole-leaf materials from selected *Aloe* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 200, 1–7. [\[Crossref\]](#)
35. Visuthikosol, V., Chowchuen, B., Sukwanarat, Y., Sriurairatana, S., Boonpucknavig, V. (1995). Effect of *Aloe vera* gel to healing of burn wound a clinical and histologic study. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 78(8), 403-409.
36. Bahramsoltani, R., Farzaei, M.H., Rahimi, R. (2014). Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: An integrative review. *Archives of Dermatological Research*, 306(7), 601–617. [\[Crossref\]](#)
37. Hashemi, S.A., Madani, S.A., Abediankenari, S. (2015). The review on properties of *Aloe vera* in healing of cutaneous wounds. *BioMed Research International*, 2015, 714216. [\[Crossref\]](#)
38. Kumar, S., Yadav, J.P. (2014). Ethnobotanical and pharmacological properties of *Aloe vera*: a review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(48), 1387–1398.
39. Pugh, N., Ross, S.A., ElSohly, M.A., Pasco, D.S. (2001). Characterization of aloeride, a new high-molecular-weight polysaccharide from *Aloe vera* with potent immunostimulatory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 1030–1034. [\[Crossref\]](#)
40. Ozsoy, N., Candoken, E., Akev, N. (2009). Implications for degenerative disorders: antioxidative activity, total phenols, flavonoids, ascorbic acid, β -carotene and α -tocopherol in *Aloe vera*.

Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2(2), 99–106.

41. Kaithwas, G., Singh, P., Bhatia, D. (2014). Evaluation of in vitro and in vivo antioxidant potential of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) gel. *Drug and Chemical Toxicology*, 37(2), 135–143. [\[Crossref\]](#)
42. Rodrigues Oliveira, L.L., de Oliveira, A.C.L., Tabrez, S., Shakil, S., Khan, M.I., Asghar, M.N., Matias, B.D., Alves da Silva Batista, J.M., Rosal, M.M., Fulgencio de Lima, M.M.D., Ferreira Gomes, S.R., de Carvalho, R.M., de Moraes, G.P., Oliveira Barros de Alencar, M.V., Islam, M.T., de Carvalho Melo-Cavalcante, A.A. (2018). Mutagenic, antioxidant and wound healing properties of *Aloe vera*. *Journal of Ethnopharmacology*, 227, 191–197. [\[Crossref\]](#)
43. Capasso, F., Borrelli, F., Capasso, R., Di Carlo, G., Izzo, A.A., Pinto, L., Mascolo, N., Castaldo, S., Longo, R. (1998). *Aloe* and its therapeutic use. *Phytotherapy Research*, 12, 124–127. [\[Crossref\]](#)
44. Tizard, I.R., Ramamoorthy, L. (2004). *Aloes* and the immun system. In: Reynolds T. (Ed), *Aloes: The Genus Aloe* (e-Book), (pp. 324–45). Boca Raton: CRC Press
45. Lee, W., Yang, S., Lee, C., Park, E.K., Kim, K.M., Ku, S.K., Bae, J.S. (2019). Aloin reduces inflammatory gene iNOS via inhibition activity and p-STAT-1 and NF- κ B. *Food and Chemical Toxicology*, 126, 67–71. [\[Crossref\]](#)
46. Heng, H.C., Zulfakar, M.H., Ng P.Y. (2018), Pharmaceutical Applications of *Aloe vera*. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 29(3), 101–116. [\[Crossref\]](#)
47. Maan, A.A., Nazir, A., Khan, M.K.I., Ahmad, T., Zia, R., Murid, M, Abrar, M. (2018). The therapeutic properties and applications of *Aloe vera*: A review. *Journal of Herbal Medicine*, 12, 1-10. [\[Crossref\]](#)
48. Salehi, B., Albayrak, S., Antolak, H., Kręgiel, D., Pawlikowska, E., Sharifi-Rad, M., Uprety, Y., T souh Fokou, P.V., Yousef, Z., Zakaria, Z.A., Varoni E.M., Sharopov, F., Martins, N., Iriti M., Sharifi-Rad, J. (2018). *Aloe* genus plants: From farm to food applications and phytopharmacotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2843. [\[Crossref\]](#)
49. Surjushe, A., Vasani, R., Saple, D. (2008). *Aloe vera*: A short review. *Indian Journal of Dermatology*, 53(4), 163–166.
50. Steenkamp, V., Stewart, M.J. (2007). Medicinal applications and toxicological activities of *Aloe* products. *Pharmaceutical Biology*. 45(5), 411–420. [\[Crossref\]](#)
51. Akev, N. (2007). Effect of *Aloe vera* pulp extract on Ehrlich ascites tumours in mice. *European Journal of Cancer Prevention*, 16(2), 151-157. [\[Crossref\]](#)
52. El-Shemy, H., Aboul-Soud, M., Aboul-Enein, K., Nassr-Allah, A., Kabash, A., Yagi, A. (2010). Antitumor properties and modulation of antioxidant enzymes activity by *Aloe vera* leaf active principles isolated via supercritical carbon dioxide extraction. *Current Medicinal Chemistry*, 17(2), 129–138. [\[Crossref\]](#)
53. Tomasin, R., Gomes-Marcondes, M.C.C. (2011). Oral administration of *Aloe vera* and honey reduces walker tumour growth by decreasing cell proliferation and increasing apoptosis in tumour tissue. *Phytotherapy Research*, 25, 619–623. [\[Crossref\]](#)

54. Liu, R.H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 134(12), 3479–3485. [Crossref]
55. Akaberi, M., Sobhani, Z., Javadi, B., Sahebkar, A., Emami, S.A. (2016). Therapeutic effects of *Aloe* spp. in traditional and modern medicine: A review. *Biomedicine&Pharmacotherapy*, 84, 759–772. [Crossref]
56. Halder, S., Mehta, A.K., Mediratta, P.K. (2013). *Aloe vera* improves memory and reduces depression in mice. *Nutritional Neuroscience*, 16(6), 250–254. [Crossref]
57. Abdollahnejad, F., Mosaddegh, M., Nasoohi, S., Mirnajafi-Zadehc, J., Kamalinejadd, M., Faizi, M. (2016). Study of sedative-hypnotic effects of *Aloe vera* L. aqueous extract through behavioral evaluations and EEG recording in rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 15(1), 293–300.
58. Shida, T., Yagi, A., Nishimura H., Nishioka, I. (1985). Effect of *Aloe* extract on peripheral phagocytosis in adult bronchial asthma. *Planta Medica*, 51(3), 273–275. [Crossref]
59. Kar, A., Panda, S., Bharti, S. (2002). Relative efficacy of three medicinal plant extracts in the alteration of thyroid hormone concentrations in male mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(2), 281–285. [Crossref]
60. EMA Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). (2017). European Union herbal monograph on *Aloe barbadensis* Mill . and on *Aloe* (various species , mainly *Aloe ferox* Mill . and its hybrids), folii succus siccatus. European Medicines Agency: London.
61. Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü web sitesi. (2018). *Aloe vera* (L.) Burm. f.'nin Yapraklarından Elde Edilen *Aloe vera* Jel ve Renksizleştirilmiş Yaprak Usaresi'nin Gıdalarda Kullanımının Güvenilirliğinin Değerlendirilmesi Hakkında Bilimsel Görüş. From [www.tarimorman.gov.tr] Erişim tarihi: 18.02.2019.
62. U.S. FDA. (2002). U.S. Food and Drug Administration - Status of Certain Additional Over-the-Counter Drug Category II and III Active Ingredients. Vol. 67. No. 90 / Thursday, May 9, 2002 / Rules and Regulations. 21 CFR Part 310.
63. Shahzad, M.N., Ahmed, N. (2013). Effectiveness of *Aloe vera* gel compared with 1% silver sulphadiazine cream as burn wound dressing in second degree burns. *The Journal of the Pakistan Medical Association*, 63(2), 225–230.
64. Irani, P.S., Varaie, S. (2016). Comparison of the effect of *Aloe vera* gel and nitrofurazone 2% on epithelialization and granulation tissue formation regarding superficial second-degree burns. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 41(3), S3.
65. Najafian, Y., Khorasani, Z.M., Najafi, M.N., Hamed, S., Mahjour, M., Feyzabadi, Z. (2019). Efficacy of *Aloe vera*/Plantago major gel in diabetic foot ulcer: A randomized double-blind clinical trial. *Current Drug Discovery Technologies*, 16(2), 223-231. [Crossref]
66. Avijgan, M., Alinaghian, M., Esfahani, M.H. (2017). *Aloe vera* gel as a traditional and complementary method for chronic skin burn: A case report. *Advances in Infectious Diseases*. 7(1), 19–25. [Crossref]
67. Avijgan, M., Kamran, A., Abedini, A. (2016). Effectiveness of *Aloe vera* Gel in Chronic Ulcers in Comparison with Conventional Treatments (Poster). *Iranian Journal of Medical Sciences*.

- 41(3), S30.
68. Panahi, Y. (2015). Comparative trial of *Aloe vera*/olive oil combination cream versus phenytoin cream in the treatment of chronic wounds. *Journal of Wound Care*, 24(10), 62–65. [\[Crossref\]](#)
 69. Molazem, Z., Mohseni, F., Younesi, M., Keshavarzi, S. (2014). *Aloe vera* gel and cesarean wound healing: A randomized controlled clinical trial. *Global Journal of Health Science*, 7(1), 203–209. [\[Crossref\]](#)
 70. Syed, T.A. (1996). Management of psoriasis with *Aloe vera* extract in a hydrophilic cream: A placebo-controlled, double-blind study. *Tropical Medicine and International Health*, 1(4), 505–509. [\[Crossref\]](#)
 71. Seyger, M.M.B., Van De Kerkhof, P.C.M., Van Vlijmen-Willems, I.M.J.J., De Bakker, E.S.M., Zwiers, F., De Jong, E.M.G.J. (1998). The efficacy of a new topical treatment for psoriasis: Mirak. *The Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 11, 13–18. [\[Crossref\]](#)
 72. Haddad, P., Amouzgar-Hashemi, F., Samsami, S., Chinichian, S., Oghabian, M.A. (2013). *Aloe vera* for prevention of radiation-induced dermatitis: A self-controlled clinical trial. *Current Oncology*, 20, 345–348. [\[Crossref\]](#)
 73. Yogi, V., Singh, O.P., Mandloi, V., Ahirwar, M. (2018). Role of topical *Aloe vera* gel in the recovery of high-grade, radiation-induced dermatitis. *Clinical Cancer Investigation Journal*, 7, 167–170. [\[Crossref\]](#)
 74. Paulsen, E., Korsholm, L., Brandrup, F. (2005). A double-blind, placebo-controlled study of a commercial *Aloe vera* gel in the treatment of slight to moderate psoriasis vulgaris. *The Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 19, 326–331. [\[Crossref\]](#)
 75. Choonhakarn, C., Busaracome, P., Sripanidkulchai, B., Sarakarn, P. (2010). A prospective, randomized clinical trial comparing topical aloe vera with 0.1% triamcinolone acetonide in mild to moderate plaque psoriasis. *The Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 24, 168–172. [\[Crossref\]](#)
 76. Ahmadloo, N., Kadkhodaei, B., Omidvari, S., Mosalaei, A., Ansari, M., Nasrolahi, H., Hamedi S.H., Mohammadianpanah, M. (2017). Lack of Prophylactic Effects of *Aloe vera* Gel on Radiation Induced Dermatitis in Breast Cancer Patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 18(4), 1139–1143. [\[Crossref\]](#)
 77. Merchant, T.E., Bosley, C., Smith, J., Baratti, P., Pritchard, D., Davis, T., Li, C., Xiong, X. (2007). A phase III trial comparing an anionic phospholipid-based cream and *Aloe vera*-based gel in the prevention of radiation dermatitis in pediatric patients. *Radiation Oncology*, 2, 45. [\[Crossref\]](#)
 78. Olsen, D.L., Raub, W., Bradley, C., Johnson, M., Macias, J.L., Love, V., Markoe, A. (2001). The effect of *Aloe vera* gel/mild soap versus mild soap alone in preventing skin reactions in patients undergoing radiation therapy. *Oncology Nursing Forum*, 28(3), 543-547.
 79. Hoopfer, D., Holloway, C., Gabos, Z., Alidrisi, M., Chafe, S., Krause, B., Lees, A., Mehta, N., Tankel, K., Strickland, F., Hanson, J., King, C., Ghosh, S., Severin, D. (2015). Three-arm randomized phase III trial: Quality *Aloe* and placebo cream versus powder as skin treatment during breast cancer radiation therapy. *Clinical Breast Cancer*, 15(3), 181-190.e4. [\[Crossref\]](#)
 80. Farrugia, C.J.E., Burke, E.S., Haley, M.E., Bedi, K.T., Gandhi, M.A. (2019). The use of *Aloe vera*

- in cancer radiation: An updated comprehensive review. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 35, 126–130. [\[Crossref\]](#)
81. Yee, C., Wang, K., Asthana, R., Drost, L., Lam, H., Lee, J., Vesprini, D., Leung, E., Deangelis, C., Chow, E. (2018). Radiation-induced skin toxicity in breast cancer patients: A systematic review of randomized trials. *Clinical Breast Cancer*, 18(5), 825–840. [\[Crossref\]](#)
 82. Chew, Y.L., Al-Nema, M., Ong, V.W.M. (2018). Management and treatment of atopic dermatitis with modern therapies, complementary and alternative medicines: a review. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 18, 67–76. [\[Crossref\]](#)
 83. Hajheydari, Z., Saeedi, M., Morteza-Semnani, K., Soltani, A. (2014). Effect of *Aloe vera* topical gel combined with tretinoin in treatment of mild and moderate acne vulgaris: A randomized, double-blind, prospective trial. *Journal of Dermatological Treatment*, 25(2), 123–129. [\[Crossref\]](#)
 84. Mazzarello, V., Donadu, M., Ferrari, M., Piga, G., Usai, D., Zanetti, S., Sotgiu, M.A. (2018). Treatment of acne with a combination of propolis, tea tree oil, and *Aloe vera* compared to erythromycin cream: two double-blind investigations. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, 10, 175–181. [\[Crossref\]](#)
 85. Syed, T.A. (1996). *Aloe vera* extract 0.5% in hydrophilic cream versus *Aloe vera* gel for the management of genital herpes in males. A placebo-controlled, double-blind, comparative study. *The Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 7, 294–5. [\[Crossref\]](#)
 86. Syed, T.A., Afza, M., Ahmad, S.A., Holt, A., Ahmad, S.A., Ahmad, S. (1997). Management of genital herpes in men with 0.5% *Aloe vera* extract in a hydrophilic cream: A placebo-controlled double-blind study. *Journal of Dermatological Treatment*, 8, 99–102. [\[Crossref\]](#)
 87. Vardy, D., Cohen, A., Tchetov, T., Medvedovsky, E., Biton, A. (1999). A double-blind, placebo-controlled trial of an *Aloe vera* (*A. barbadensis*) emulsion in the treatment of seborrheic dermatitis. *Journal of Dermatological Treatment*, 10(1), 7–11. [\[Crossref\]](#)
 88. Panahi, Y., Sharif, M.R., Sharif, A., Beiraghdar, F., Zahiri, Z., Amirchoopani, G., Marzony, E.T., Sahebkar, A. (2012). A randomized comparative trial on the therapeutic efficacy of topical *Aloe vera* and *Calendula officinalis* on diaper dermatitis in children. *The Scientific World Journal*, 2012, 810234. [\[Crossref\]](#)
 89. Badelbuu, S.G., Javadzadeh, Y., Jabraeili, M., Heidari, S., Bostanabad, M.A. (2018). Evaluation of the effect of *Aloe vera* ointment with chamomile ointment on severity of children's diaper dermatitis: A randomized, double-blind clinical trial. *Middle East Journal of Family Medicine*, 16(3), 47–51.
 90. Zhang, Y., Liu, W., Liu, D., Zhao, T., Tian, H. (2016). Efficacy of *Aloe vera* supplementation on prediabetes and early non-treated diabetic patients: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients*. 8(7), 388. [\[Crossref\]](#)
 91. Walid, R., Hafida, M., Abdelhamid, E.H.I., Reda, B., Rachid, A., Mohamed, B. (2018). Beneficial effects of *Aloe vera* gel on lipid profile, lipase activities and oxidant/antioxidant status in obese rats. *Journal of Functional Foods*, 48, 525–532. [\[Crossref\]](#)
 92. Choi, H.C., Kim, S.J., Son, K.Y., Oh, B.J., Cho, B.L. (2013). Metabolic effects of *Aloe vera* gel complex in obese prediabetes and early non-treated diabetic patients: Randomized controlled trial. *Nutrition*, 29(9), 1110–1114. [\[Crossref\]](#)

93. Yun, J.M., Singh, S., Jialal, R., Rockwood, J., Jialal, I., Devaraj, S. (2010). A randomized placebo-controlled crossover trial of *Aloe vera* on bioavailability of Vitamins C and B12, blood glucose, and lipid profile in healthy human subjects. *Journal of Dietary Supplements*, 7(2), 145–153. [\[Crossref\]](#)
94. Mentreddy, S., Mohamed, A., Rimando, A. (2005). Medicinal plants with hypoglycemic/ anti-hyperglycemic properties: A review. *Association for the Advancement of Industrial Crops Conference*, 20, 341–353.
95. Reynolds, T., Dweck, A.C. (1999). *Aloe vera* leaf gel: A review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 68(1–3), 3–37. [\[Crossref\]](#)
96. Park, C.H., Son, H.U., Yoo, C.Y., Lee, S.H. (2017). Low molecular-weight gel fraction of *Aloe vera* exhibits gastroprotection by inducing matrix metalloproteinase-9 inhibitory activity in alcohol-induced acute gastric lesion tissues. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 2110–2115. [\[Crossref\]](#)
97. Gopinathan, S., Rameela, N. (2014). Anti-ulcer activity of aloe vera juice and *Aloe vera* and amla fruit combined juice in ethanol induced ulcerated rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(6), 190–197.
98. Keshavarzi, Z., Rezapour, T.M., Vatanchian, M., Hesari, M.Z., Haghghi, H.N., Izanlu, M., Sabaghian, M., Shahveisi, K. (2014). The effects of aqueous extract of *Aloe vera* leaves on the gastric acid secretion and brain and intestinal water content following acetic acid- induced gastric ulcer in male rats. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 4(2), 137–143.
99. Panahi, Y. (2015). Efficacy and safety of *Aloe vera* syrup for the treatment of gastroesophageal reflux disease: A pilot randomized positive-controlled trial. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 35(6), 632–636. [\[Crossref\]](#)
100. Hong, S.W., Chun, J., Park, S., Lee, H.J., Im, J.P., Kim, J.S. (2018). *Aloe vera* is effective and safe in short-term treatment of irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 24(4), 528–535. [\[Crossref\]](#)
101. Langmead, L. (2004). Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral *Aloe vera* gel for active ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 19(7), 739–747. [\[Crossref\]](#)
102. Rahmani, N., Khademloo, M., Vosoughi, K., Assadpour, S. (2014). Effects of *Aloe vera* cream on chronic anal fissure pain, wound healing and hemorrhaging upon defecation: A prospective double blind clinical trial. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 18, 1078–1084.
103. Alinejad-Mofrad, S., Foadoddini, M., Saadatjoo, S.A., Shayesteh, M. (2015). Improvement of glucose and lipid profile status with *Aloe vera* in pre-diabetic subjects: A randomized controlled-trial. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 14, 22. [\[Crossref\]](#)
104. Zarrintan, A., Mobasser, M., Zarrintan, A., Ostadrahimi, A. (2015). Effects of *Aloe vera* supplements on blood glucose level and lipid profile markers in type 2 diabetic patients: A randomized clinical trial. *Pharmaceutical Sciences*, 21, 65–71. [\[Crossref\]](#)
105. Huseini, H.F., Kianbakht, S., Hajiaghaee, R., Dabaghian, F.H. (2012) Anti-hyperglycemic and anti-hypercholesterolemic effects of *Aloe vera* leaf gel in hyperlipidemic type 2 diabetic patients:

- a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Planta Medica*, 78, 311–316. [\[Crossref\]](#)
106. Yagi, A., Hegazy, S., Kabbash, A., Wahab, E.A.E. (2009). Possible hypoglycemic effect of *Aloe vera* L. high molecular weight fractions on type 2 diabetic patients. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 17(3), 209–215. [\[Crossref\]](#)
107. Al-Maweri, S.A., Ashraf, S., Lingam, A.S., Alqutaibi, A., Abdulrab, S., Alaizari, N., Halboub, E. (2018). *Aloe vera* in treatment of oral submucous fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 48(2), 99-107. [\[Crossref\]](#)
108. Nair, G.R. (2016). Clinical Effectiveness of *Aloe vera* in the Management of Oral Mucosal Diseases-A Systematic Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 10(8), ZE01–7. [\[Crossref\]](#)
109. Gao, Y., Kuok, K.I., Jin, Y., Wang, R. (2018). Biomedical applications of *Aloe vera*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(1), S244-S256. [\[Crossref\]](#)
110. Koga, A. Y., Pereira, A.V., Lipinski, L.C., Oliveira, M.R.P. (2018). Evaluation of wound healing effect of alginate films containing *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) gel. *Journal of Biomaterials Applications*, 32(9), 1212–1221. [\[Crossref\]](#)
111. Pereira, G.G., Guterres, S.S., Balducci, A.G., Colombo, P., Sonvico, F. (2014). Polymeric films loaded with vitamin e and *Aloe vera* for topical application in the treatment of burn wounds. *BioMed Research International*, 2014, 641590. [\[Crossref\]](#)
112. Krishnaveni, V., Aparna, B. (2014). Microencapsulation of copper enriched *Aloe* gel curative garment for atopic dermatitis. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 13(4), 795–803.
113. Ghayempour, S., Montazer, M., Mahmoudi Rad, M. (2016). Encapsulation of *Aloe vera* extract into natural Tragacanth Gum as a novel green wound healing product. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 344–349. [\[Crossref\]](#)
114. Tippayawat, P., Phromviyo, N., Boueroy, P., Chompoosor, A. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles in *Aloe vera* plant extract prepared by a hydrothermal method and their synergistic antibacterial activity. *PeerJ*, 4, e2589. [\[Crossref\]](#)
115. Morgan, M., Bone, K., Mills, S., McMillan, J. (2005). *Aloe*: Safety monograph. In S. Mills ve K. Bone (Eds.), *The essential guide to herbal safety* (pp. 233–240). St. Louis (MO): Elsevier Churchill Livingstone.
116. Gupta, RC., Chang, D., Nammi, S., Bensoussan, A., Bilinski, K., Roufogalis, BD. (2017). Interactions between antidiabetic drugs and herbs: An overview of mechanisms of action and clinical implications. *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 9, 59. [\[Crossref\]](#)
117. Braun, L., Cohen, M. (2007). *Herbs ve Natural Supplements*, Elsevier, Australia.
118. Parlatti, L., Voican, C.S., Perlemuter, K., Perlemuter, G. (2017). *Aloe vera*-induced acute liver injury: A case report and literature review. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 41(4), e39–e42. [\[Crossref\]](#)
119. Tekin, F., Şahin, O. Z., Karasu, Z., Nart, D., Özütemiz, Ö., Ersöz, G., Batur, Y., İltar, T. (2006). *Aloe vera*'ya bağlı ciddi toksik hepatit:Olgu sunumu. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi*, 5(2),

- 134–136.
120. Kanat, O., Ozet, A., Ataergin, S. (2006). *Aloe vera*-induced acute toxic hepatitis in a healthy young man. *European Journal of Internal Medicine*, 17, 589. [Crossref]
 121. Baretta, Z., Ghiotto, C., Marino, D., Jirillo, A. (2009). *Aloe*-induced hypokalemia in a patient with breast cancer during chemotherapy. *Annals of Oncology*, 20, 1445–1446. [Crossref]
 122. Maenthaisong, R., Chaiyakunapruk, N., Niruntraporn, S., Kongkaew, C. (2007). The efficacy of *Aloe vera* used for burn wound healing: A systematic review. *Burns*, 33, 713–718. [Crossref]
 123. National Toxicology Program. (2016). *Aloe vera* Fact Sheet. From [www.niehs.nih.gov] Erişim tarihi: 08.04.2018.
 124. International Aloe Science Council (IASC). (2013). *Aloe vera* Quality Standard. From [www.iasc.org] Erişim tarihi: 03.04.2018.
 125. International Aloe Science Council (IASC). (2009). IASC Labeling Guidance. From [www.iasc.org] Erişim tarihi: 03.04.2018.
 126. NCCIH. (2016). *Aloe Vera*. From [nccih.nih.gov] Erişim tarihi: 16.04.2019.
 127. European Food Safety Authority (EFSA). (2012). Compendium of botanicals reported to contain naturally occurring substances of possible concern for human health when used in food and food supplements. *EFSA Journal*, 10(5):2663.
 128. EMA Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). (2016). Assessment report on *Aloe barbadensis* Mill. and on *Aloe* (various species, mainly *Aloe ferox* Mill. and its hybrids), *folii succus siccatus*. From [www.ema.europa.eu] Erişim tarihi: 06.12.2018.
 129. The European Community. (2008). European Community Position Codex Committee On Food Additives. From [ec.europa.eu] Erişim tarihi: 11.11.2018.
 130. Radha, M.H., Laxmipriya, N.P. (2015). Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of *Aloe vera*: A systematic review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 5(1), 21–26. [Crossref]
 131. Fox, L.T., Mazumder, A., Dwivedi, A., Gerber, M., du Plessis, J., Hamman, J.H. (2017). In vitro wound healing and cytotoxic activity of the gel and whole-leaf materials from selected *Aloe* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 200, 1–7. [Crossref]
 132. Habtemariam, S. (2017). Could We Really Use *Aloe vera* Food Supplements to Treat Diabetes? Quality Control Issues. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 4856412. [Crossref]



İN VİTRO DERİ MODELLERİ

IN VITRO SKIN MODELS

Ömer YEDİKAYA , F. Ulya BADILLI * 

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 06560, Ankara,
Türkiye

ÖZ

Amaç: Topikal veya sistemik etki sağlamak için deriye uygulanan formülasyonların tasarımında ve optimizasyonunda deri modellerinin kullanımı büyük önem taşımaktadır. Etken maddelerin deriden penetrasyon / permeasyon çalışmalarında sıçan veya domuz derisi sıklıkla kullanılmakta ancak hayvan derisinden elde edilen sonuçların insan derisi ile uygunluğu sorgulanmaktadır. Diğer taraftan insan derisinin kullanımı ise, temininin genellikle zor olması ve etik kaygılar nedeniyle sınırlıdır. Bu durum, in vitro deriden permeasyon testlerinin önemini artırmaktadır. Bu derlemede, en sık kullanılan in vitro deri modellerinin avantajları ve dezavantajları vurgulanarak, bu modeller ile gerçekleştirilen güncel çalışmalar incelenmiştir.

Sonuç ve Tartışma: Yapay membranlar; tekrar üretilebilirlik, düşük maliyet, kullanım kolaylığı ve modifiye edilebilir olması gibi birçok avantajı sebebiyle insan ve hayvan derisi yerine tercih edilmektedir. Yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğerlerinin ise, veri tekrarlanabilirliğinin yüksek olması, etik kurul izni gerekmemesi, deri metabolizmasının, deri korozyonunun ve fototoksisitenin değerlendirilebilmesi gibi avantajları bulunmaktadır. Yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğerlerinin bütün bu avantajlarına ve geliştirilmesindeki önemli adımlara rağmen, etken maddelerin deriden absorpsiyonunun in vivo tahmini için insan veya hayvan derisinin yerini tamamen almaları henüz tam anlamıyla mümkün değildir. Yeniden yapılandırılmış deri modellerinin kullanımını sınırlayan en önemli faktörlerin başında, yüksek maliyet ve düşük bariyer fonksiyonları gelmektedir.

Anahtar Kelimeler: Deriden penetrasyon / permeasyon çalışmaları, in vitro deri modelleri, yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğerleri, yapay deri modelleri

ABSTRACT

Objective: The use of skin models is of great importance in the design and optimization of formulations applied to the skin for topical or systemic effects. Although rat or pig skin is often used in skin penetration/permeation studies of active substances, the compatibility of results obtained from animal skin and human skin is questioned. On the other hand, the use of human skin is limited since it is difficult to attain and due to the ethical concerns. This situation increases the importance of in vitro skin permeation tests. In this review, the advantages and disadvantages of the most commonly used in vitro skin models were emphasized, and current studies performed with these models were reviewed.

* **Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** F. Ulya Badilli
e-posta / e-mail: unuman@pharmacy.ankara.edu.tr, **Tel. / Phone:** +903122033150

Result and Discussion: *Artificial membranes are preferred over human and animal skin due to many advantages such as reproducibility, low cost, ease of use and able to modify. Reconstructed human skin equivalents have advantages such as high data repeatability, nonnecessity of ethics committee approval and availability for the evaluation of skin metabolism, corrosion and phototoxicity. Despite all these advantages of reconstructed human skin equivalents and important steps in their development, it is not yet entirely possible replacing human or animal skin completely for in vivo estimation of absorption of active ingredients through the skin. The most important factors limiting the use of reconstructed skin models are their high cost and low barrier functions.*

Keywords: *Artificial skin models, in vitro skin models, reconstructed human skin equivalents, skin penetration/permeation studies*

GİRİŞ

Çok sayıda etken / aktif madde, deride terapötik veya kozmetik etki oluşturmak amacıyla uygulanmaktadır. Deri, etken madde absorpsiyonu için kolayca erişilebilen bir yüzey alanı sunmaktadır. Ancak derinin sahip olduğu bariyer fonksiyonu, maddelerin deri yoluyla uygulanmasını sınırlandıran önemli bir faktördür [1].

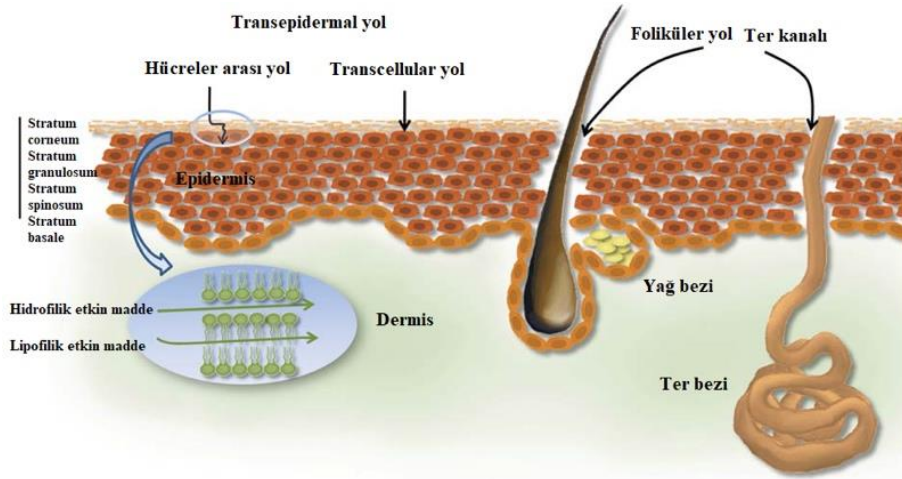
Topikal veya sistemik etki sağlamak için deriye uygulanan formülasyonların tasarımında ve optimizasyonunda, formülasyonun özelliklerini değerlendirebilmek için deri modellerinin kullanımı büyük önem taşımaktadır. Etken madde penetrasyonuna katkıda bulunan kritik formülasyon özellikleri belirlendikten sonra formülasyonun optimizasyonu mümkün hale gelmektedir [2].

Eksizyonla elde edilen insan derisi, kimyasalların transdermal ve topikal verilmesini değerlendirmek için “altın standart” olarak kabul edilen dokudur [3]. Bununla birlikte, insan dokusunun temininin genellikle zor olması ve etik kaygılar, uygulamalarda birtakım kısıtlamalara neden olmaktadır. Ayrıca donörün cinsiyeti, ırkı, yaşı ve anatomik bölgesi ile ilgili varyasyonlar sonucu standardizasyonun düşük olması da önemli bir dezavantajdır [4]. Hayvan derisinin kullanımı, hem yeni etken maddelerin geliştirilmesinde hem de deriye uygulanmaya yönelik yeni ilaç formülasyonlarının tasarımında temel yaklaşım olmuştur [5]. Domuz derisi, insan derisine kıyasla daha düşük bariyer işlevine sahip olmasına rağmen insan derisinin permeabilitesini tahmin etmek için uygun bir doku olarak kabul edilmiştir [4, 6, 9]. Diğer taraftan literatürde, sıçan (rat) derisi kullanılarak penetrasyon / permeasyon incelemelerinin gerçekleştirildiği çok sayıda çalışmada da mevcuttur [10-14]. Hayvan derisi kullanımında sıklıkla karşılaşılan problemler arasında permeabilite, hücre tipi, lipid bileşimi ve organizasyonu ve diğer fizyolojik özellikler açısından insan derisine kıyasla farklılık göstermeleri sayılabilmektedir [15]. Diğer taraftan Avrupa Birliği, insan dokusu kullanarak finansal kazanç elde edilmesini ve 2009 yılından bu yana da, kozmetik ürünler için toksikolojik veri toplamak amacıyla hayvanların kullanılmasını yasaklamıştır [16]. Ayrıca 2018'de, Avrupa İlaç Ajansı'nın topikal ürünlerin kalitesi ve eşdeğerliği hakkındaki taslak kılavuzu, bitmiş bir topikal dozaj formunun performansını daha iyi anlamak ve karakterize etmek için sentetik membranların kullanılmasını önermektedir [17]. Bu durum, *in vitro* deriden penetrasyon / permeasyon testlerinin önemini büyük ölçüde artırmaktadır.

Deri ve Derinin Bariyer Özellikleri

Deri, insan vücut ağırlığının yaklaşık % 16'sını oluşturur ve yetişkinlerde yaklaşık 2 m² yüzey alanına sahiptir [18]. Dış çevreye karşı fiziksel bir bariyer oluşturur, su, elektrolit ve ısı kaybını önleyerek homeostazı sağlar ve vücudu mikroorganizmalara, toksik ajanlara ve ultraviyole ışınlar karşı korur. Deri epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere üç temel katmandan oluşur. Deri ekleri olarak tanımlanan saçlar, tırnaklar, yağ bezleri ve ter bezleri (apokrin ve ektrin bezler) deriden köken alır. Derinin kalınlığı bireyin yaşına ve anatomik bölgeye göre değişir [19, 20].

Derinin temel bariyer özelliği, en üst tabaka olan stratum korneum (SC)'dan ileri gelmektedir [21, 22] ancak bütün olarak epiderminin rolü ihmal edilmemelidir [23]. Deriden etken maddenin geçişi transepidermal yolla veya deri ekleri aracılığıyla gerçekleşebilmektedir (Şekil 1) [24, 25]. Etken maddeye ait fizikokimyasal parametreler (molekül ağırlığı, hidrojen bağı yapma kapasitesi ve oktanol-su partisyon katsayısı gibi) maddenin deriye penetrasyon potansiyelini belirlemektedir [24]. Etken maddenin deriden penetrasyonu, doğru taşıyıcı seçimi ile artırılabilir. Taşıyıcı ve etken madde arasındaki etkileşimler, formülasyon geliştirme çalışmalarında oldukça önemli bir yere sahiptir [26].



Şekil 1. Transdermal geçiş yolları: transepidermal yol (hücreler arası ve transsellüler yol) ve diğer yollar (foliküler yol ve ter kanalı) [28]

Deriden geçiş pasif difüzyonla olmaktadır, bu nedenle *in vitro* deri modelleri bu süreci oldukça uygun bir şekilde taklit edebilmektedir. Ancak, herhangi bir modellemede taklit edilmesi oldukça zor olan özellik, özellikle epiderminin canlı kısımlarında meydana gelen ve hedeflenen sistemik etki için molekülün biyoyararlanımını önemli ölçüde azaltan metabolik faaliyetlerdir [27].

Deri Modelleri

In vitro deri modelleri, yapay deri modelleri ve yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğerleri olmak üzere iki ana başlık altında sınıflandırılabilir.

Yapay Deri Modelleri

Etken madde permeasyonunu incelemek için basit ve tekrarlanabilir bir alternatif sunan yapay model membranlar, etkili bir formülasyon tasarımı ve optimum penetrasyon artırıcı seçimi için önemli olan taşıyıcı-membran etkileşimlerini değerlendirmek amacıyla tercih edilmektedir [29, 30]. Yapay modellerin çoğu, sağlam bariyer özelliklerine sahip sağlıklı deriyi taklit etmek için kullanılır. Nispeten az sayıdaki yapay model, bütünlüğü bozulmuş deriyi taklit etme potansiyeli sunmaktadır [31]. İlk yapay modeller, deride bulunan lipit fazı yerine, filtre kağıdına izopropil miristat (IPM) emdirilmesi ile elde edilmiş membranlar olmuştur [32]. Deriden permeasyonu modellemek için kullanılan diğer lipitler, tetradekan, linoleik asit ve IPM içindeki fosfolipit dispersiyonlarını içermektedir [33]. *In vitro* permeasyon çalışmaları, poli (dimetilsiloksan) gibi polimerik membranlarla da gerçekleştirilmiştir [34, 35, 36]. Literatürde Franz difüzyon hücreleri ile sıklıkla kullanılan sentetik membranlar selüloz bazlı ve polimerik bazlı membranlar olmak üzere iki ana gruba ayrılabilir. Selüloz bazlı membranlar selüloz asetat, selüloz nitrat ve rejenere selülozdan (Visking®, Cuprophan®, SpectraPor®) üretilmektedir. Polimer bazlı membranlardan en çok kullanılanları ise naylon, polisülfon (Tuffryn®, Supor®) ve polikarbonat (Nuclepore®, Cyclopore®) membranlardır. Bu membranlar genel olarak gözenekler içermeleri, kimyasal olarak nispeten inert ve çözücülerle büyük ölçüde geçimli olmaları ve ticari olarak temin edilebilmeleri gibi avantajlara sahiptirler ve topikal ürünlerin kalite kontrolü için gerçekleştirilen *in vitro* salım deneylerinde sıklıkla kullanılmaktadırlar [37, 38]. Bu sentetik membranlarla gerçekleştirilen çalışmalar, formülasyondaki etken maddenin termodinamik aktivitesini araştırmak için yararlıdır ancak, deri ile madde arasındaki spesifik etkileşimler hakkında fikir verme konusunda yetersiz kalmaktadır [8]. Son yıllarda, silikon membranlar gibi lipit esaslı olmayan modeller [29, 39-41] ve lipit esaslı modeller gibi çeşitli yaklaşımlar ile güvenilir deri modelleri geliştirilmeye çalışılmıştır.

Lipit Esaslı Olmayan Deri Modelleri

Silikon Model Membranlar

Poli(dimetilsiloksan) (PDMS) veya silikon membranlar, farklı taşıyıcıların (sıvağların) deriden etken madde penetrasyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek için kullanılmaktadır [29]. 1970'de Nakano ve Patel, beş farklı merhem sıvağından salisilik asit salımını incelemek için silikon membranları kullanmış ve *in vitro* salım profillerinin, literatürde rapor edilen *in vivo* verilerle uyumlu olduğunu bildirmişlerdir [42]. Dias ve ark. (2007), çok sayıda taşıyıcı (mineral yağ, IPM, oleik asit, dekanol, oktanol, butanol, etanol, propilen glikol, benzoik asit, gliserin, su ve bunların karışımları) kullanarak, kafein ve salisilik asidin permeasyonu üzerine bir çalışma yürütmüştür [34]. Bir diğer çalışmada, hem hidrofilik hem de lipofilik taşıyıcıların (su, etanol, propilen glikol, mineral yağ, Miglyol 812) ibuprofen penetrasyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir [43-44]. Oliveira ve ark. (2012), dermal formülasyonlarda yaygın olarak kullanılan farklı taşıyıcıların (etanol, izopropil miristat, dimetil izosorbit, PEG 200 ve

PEG 400 ve Transcutol P) silikon model membranlar ile etkileşimlerini değerlendirmek için membran transport ve partiyon çalışmaları gerçekleştirmiştir [36].

Bu membranların, lipofilik bileşiklerin deriden geçişini tahmin etmek için kullanılabilceği ancak hidrofilik bileşikler için kullanımlarının çok uygun olmadığı önerilmiş ve modeli geliştirmek için PDMS ve PEG 6000 kopolimer emdirilmiş bir membran sistemi geliştirilmiştir. Bu geliştirilen model ile sadece sulu çözelti şeklindeki formülasyonlar test edilmiş ancak formülasyon geliştirmedeki potansiyeli henüz açıklığa kavuşturulamamıştır [46].

Strat-M

EMD Millipore tarafından ticari olarak piyasaya sürülen Strat-M[®], hem lipofilik hem de hidrofilik etken madde permeasyonunu öngörebilen sentetik bir membrandır [47]. Strat-M[®] membranları, insan epidermisine benzer yapısal ve kimyasal özellikleri taşımaktadır. İnsan derisinin çok katmanlı yapısını ve lipit organizasyonunu taklit edecek şekilde tasarlanmıştır. Her Strat-M[®] membranın kalınlığı yaklaşık 300 µm'dir; tek bir poliolefin destek üzerinde iki tabaka poröz polieter sülfon ile desteklenen çok sıkı bir üst tabakadan oluşmaktadır. Membranın bu çok tabakalı yapısı, insan derisinin farklı katmanlarını (epidermis, dermis ve subkutan doku) taklit ederek, insan derisine benzer bir morfoloji elde edilmesine olanak tanımaktadır. Poröz membran, sentetik lipitlerin uygun bir karışımı ile muamele edilmiştir. Bu sentetik membran, insan SC'sinde bulunanlara benzer belirli oranlardaki lipitlerin (seramidler, kolesterol, serbest yağ asitleri ve diğer bileşenler) kombinasyonunu içermektedir [48, 49]. Strat-M[®] membranı, seriden seriye yüksek varyasyon, güvenlik ve depolama gibi dezavantajları ortadan kaldıran, insan derisinden difüzyonu tahmin etmeyi sağlayan sentetik bir polimerik membrandır [47].

Kaur ve ark. (2018), insan, sıçan ve domuz kulak derisi ile Strat-M[®] membran kullanarak yüksek molekül ağırlıklı bir etken madde olan amfoterisin B'yi içeren nanoformülasyonlar ile deriden permeasyon çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. Amfoterisin B'nin Strat-M[®] ile elde edilen permeasyon profillerinin insan derisine benzerliğinin sıçan ve domuz derisine kıyasla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir [50]. Bir başka çalışmada, rivastigmin içeren piyasa preparatından (Exelon[®] Patch) etken madde salımını değerlendirmek için farklı sentetik polimerik membranlar ve domuz kulak derisi kullanılarak Franz difüzyon hücresinde permeasyon çalışmaları yapılmıştır. Strat-M[®], domuz kulak derisine benzer bir rivastigmin permeasyon profili göstermiştir [51].

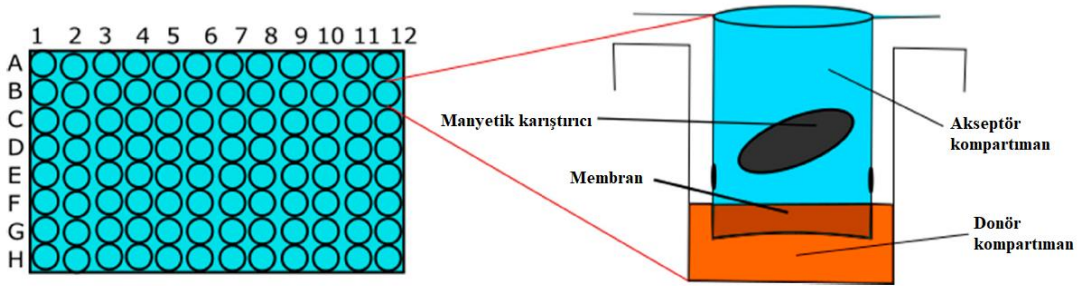
Haq ve ark. (2018), yaptıkları bir çalışmada, çeşitli penetrasyon arttırıcıların model bileşik olan nikotin deriden permeasyonunu nasıl etkilediğini değerlendirmişlerdir. Franz difüzyon hücresi yöntemiyle gerçekleştirdikleri çalışmada, insan kadavra derisi ve Strat-M[®] membranı ile elde edilen verilerin iyi bir korelasyon gösterdiği sonucuna varmışlardır [49]. Uchida ve ark. (2015), Strat-M[®]'i, insan ve hayvan derisine bir alternatif olarak kimyasal bileşiklerin deriden geçişlerini tahmin etmek üzere kullanmıştır. Strat-M[®], insan derisi ve tüysüz sıçan derisi kullanarak farklı molekül ağırlıklarına

ve oktanol/su partision katsayısına sahip on üç farklı bileşiğin permeasyon profillerini belirlemişlerdir. Çalışmada Strat-M® ile elde edilen sonuçların, insan derisi ve sıçan derisi ile elde edilenlere benzer olduğunu bulmuşlardır. Bu sonuçlar, Strat-M®'in permeasyon çalışmalarında hayvan veya insan derisine alternatif olarak kullanılabilceğini ortaya koymuştur. Daha tutarlı ve tekrarlanabilir sonuçlar, kolay kullanılabilirlik ve insan derisine kıyasla daha düşük varyasyon gibi özellikleri, Strat-M®'in deriden permeasyon çalışmaları için iyi bir alternatif olabileceğini göstermektedir [52].

Lipit Esaslı Deri Modelleri

Paralel Yapay Membran Permeabilite Tayini (PAMPA) Modeli

Paralel Yapay Membran Permeabilite Tayini (PAMPA) modeli, Kansy ve ark. (1998) tarafından etken maddelerin membranlardan permeasyonunu incelemek için geliştirilmiştir [53]. Bu *in vitro* model, ilk olarak transselüler bağırsak permeabilitesinin hızlı bir şekilde değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Orijinal PAMPA modeli, donör ve akseptör bölmelerini ayıran bir membran bariyeri ile n-dodekan içinde çözülmüş fosfatidilkolin ile kaplanmış hidrofobik bir filtre içeren yapay bir membrandan oluşur ve bu yapay membranın bileşimi modifiye edilebilmektedir (Şekil 2). Ancak membrandaki lipit - çözücü karışımları iyi karakterize edilmemiştir ve biyolojik membranlarda bulunan lipit çift tabaka katmanlarından yoksundur [54]. PAMPA, gastrointestinal membrandan [55] ve kan beyin bariyerinden [56] etken madde geçişini incelemek için kullanılmıştır. PAMPA tekniğinin deriden geçişin tahmini için kullanımı, ilk olarak Ottaviani ve ark. (2006) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, insan derisinin bariyer özelliğini taklit etmek için kullanılan membranlar, IPM veya silikon yağı veya iki bileşenin karışımları ile oluşmuş filtrelerdir [41].



Şekil 2. Paralel Yapay Membran Permeabilite Tayini (PAMPA) şematik gösterimi [57]

Sinko ve arkadaşları, SC'de bulunan doğal olarak bulunan seramidlerin sentetik analogları olan sertramidleri kullanarak, deri-PAMPA'yı geliştirmiştir [57, 58]. Sertramidler, daha uzun saklama süresine sahiptir ve doğal seramidlere kıyasla daha ucuz alternatiflerdir [59]. Sertramidler seramidlerden yapısal olarak farklı olmalarına rağmen, kıyaslanabilir molekül ağırlıkları ve hidrojen akseptör / donör

kapasiteleri nedeniyle, PAMPA sandviç membran modelinde kolesterol, stearik asit ve silikon yağı ile birlikte lipit bileşen olarak kullanılabilir [57, 58].

Deri-PAMPA ile test edilen çeşitli model etken maddelerin penetrasyon profilleri, farklı veri tabanlarındaki insan derisine ait penetrasyon verileri ile korele sonuçlar göstermiştir. Deri-PAMPA ve epidermis arasındaki korelasyon zayıf iken, deri-PAMPA ile tam kalınlıktaki deri arasında iyi bir korelasyon elde edilmiştir [58]. PAMPA modeli ile çözelti ve jel gibi farklı dozaj şekillerinden etken madde salımında gözlenebilen belirgin farklılıklar, diğer modellerde gözlenmemiştir [61, 61].

Karadzovska ve Riviere (2013) tarafından yapılan çalışmada, farklı etken maddelerin deriden penetrasyonu üzerine taşıyıcıların etkilerini değerlendirmek için deri-PAMPA, lipid esaslı olmayan deri-PAMPA ve Strat-M® membran kullanılmıştır. Elde edilen veriler, domuz derisi kullanılarak yapılan difüzyon hücresi verileriyle karşılaştırılmıştır. Bu üç membran içinde deri-PAMPA'nın SC'un lipit matrisini en iyi temsil eden model olduğu bildirilmiştir [62].

Tsinman ve Sinko (2013), ibuprofen içeren silikon bazlı anhidrid jel formülasyonu, silikon ve bir akrilik kopolimer içeren formülasyon ve ibuprofenin piyasa preparatını kullanarak deri-PAMPA'nın farklı topikal formülasyonlarının deriden penetrasyon profillerini ayırt edebilme yeteneğini değerlendirmişlerdir. Elde edilen sonuçların, insan derisi ile elde edilen permeasyon verileri ile uyumlu olduğunu bildirmişlerdir [59].

Vizserálek ve ark. (2015), transdermal ve lokal etkili terapötik yamaları test etmek için orijinal deri-PAMPA yöntemini modifiye ederek kullanmışlardır. Yapılan çalışmada dört farklı etken maddenin (nikotin, fentanil, rivastigmin ve ketoprofen) transdermal ve lokal etkili yama formundaki piyasa preparatlarını incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda, deri-PAMPA sisteminin transdermal terapötik sistemlerin gelişim sürecinde permeasyon çalışmaları için kullanılabilirliğini ifade etmişlerdir [60].

Zhang ve ark. (2019), niasinamidin deriden permeasyonunu tahmin etmek için deri-PAMPA modelinin uygunluğunu araştırmışlardır. Niasinamidin domuz derisi, insan derisi ve deri-PAMPA modeli ile elde edilen permeasyon profilleri, PAMPA'nın biyolojik dokulara kıyasla daha düşük bir bariyer fonksiyona sahip olduğunu ortaya koymuştur. Diğer taraftan, deri-PAMPA'nın deriden penetrasyonu tahmin potansiyelini tam olarak belirleyebilmek için, daha geniş bir etken madde yelpazesinin incelenmesi gerektiğini ifade etmişlerdir [63].

Kerns ve ark. (2004), PAMPA ve tek tabakalı hücre (Caco-2 ve MDR1-MDCKII) yöntemlerini kullanarak bir grup bileşiğin permeasyon profillerini karşılaştırmışlardır. Etken maddelerin pasif difüzyon ile permeasyonunda, PAMPA ve tek tabakalı hücre yöntemlerinin arasında yüksek bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir. İki yöntemin özellikleri göz önüne alındığında, PAMPA ve Caco-2'nin etken madde permeasyonunun etkili ve hızlı bir şekilde araştırılması için sinerjik olarak uygulanabileceğini önermişlerdir [64].

Luo ve ark. (2016), insan ve domuz derisinin yanısıra PAMPA modeli ve silikon membran kullanarak *in vitro* permeasyon çalışması yapmışlardır. Ticari ibuprofen formülasyonlarının ve ibuprofen çözeltilerinin kullanıldığı çalışmalarda 6 saatin sonunda ibuprofen permeasyonunun PAMPA'da insan derisinden daha fazla olduğu görülmüştür. PAMPA ve silikon membrandan elde edilen sonuçların değişkenliğinin düşük olması, bu membranların özelliklerine atfedilmiştir. Domuz ve insan derisi ile elde edilen sonuçların, biyolojik membranların karmaşık yapısı nedeniyle daha değişken olduğu ifade edilmiştir [8].

Bu yöntemle endüstrinin ilgisi, çoğunlukla yöntemin düşük maliyeti ve yüksek veriminden dolayı, son yıllarda büyük ölçüde artmıştır. PAMPA'nın, önformülasyon çalışmalarında aday moleküllerin erken aşamada fiziksel özelliklerinin belirlenmesi için iyi bir araç olduğunu gösteren birçok makale yayınlanmıştır [65].

Fosfolipit Vezikül Esaslı Permeasyon Tayini (PVPA) Modeli

Fosfolipit Vezikül Esaslı Permeasyon Tayini (PVPA) modeli, biyolojik membranlardan pasif difüzyon ile etken madde geçişini tahmin etme fırsatı sunan bir yöntemdir. Biyolojik membranları taklit eden bariyer, bir filtre desteği üzerinde çok sıkı ve yoğun bir lipozom tabakasından oluşmaktadır. Orijinal PVPA, bağırsak geçirgenliğinin değerlendirilmesi için geliştirilen bir modeldir [66]. Şekil 3'de gösterildiği gibi bariyerde hem daha küçük tek katmanlı ve daha büyük çok katmanlı yapıların bulunduğu PVPA modelinin, yüksek verimli bir model olarak çalışma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir [67]. Kullanılan lipozomların bileşimi, çeşitli absorpsiyon bölgelerindeki bariyerleri taklit edecek şekilde ayarlanabilir.

Son zamanlarda, derinin SC bariyerini taklit eden yeni bir PVPA modeli geliştirilmiştir. Orijinal PVPA modeli üzerinde, deriden etken madde penetrasyonu tahmininde kullanılmak üzere modifikasyon yapılmıştır. Modifikasyonla hazırlanan modeller, kolesterol ve yumurta fosfatidilkolinden yapılmış lipozomlar kullanılarak hazırlanan PVPA_c ve deride bulunan ana lipit sınıfları (seramid, kolesterol, serbest yağ asidi ve kolesteril sülfat ve yumurta fosfatidilkolin) kullanılarak hazırlanan PVPA_s'tir (Şekil 3). İki PVPA deri modelinde altı bileşiğin (flufenamik asit, ibuprofen, indometazin, salisilik asit, kalsein ve FITC-dekstran) permeasyon profili değerlendirilmiştir. Permeasyon deneylerinden elde edilen sonuçların, bir değer dışında, hayvan derisi penetrasyon deneylerinden elde edilen verilerle uyumlu olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, PVPA modelinin bariyer fonksiyonunun kontrollü bir şekilde modifiye edilebildiği ve hazırlama koşulları değiştirilerek, potansiyel olarak farklı derecelerde bozulmuş deriyi temsil eden farklı sızıntı derecelerine sahip lipit esaslı bariyerlerin tekrarlanabilir şekilde hazırlanabildiği ifade edilmiştir [68].

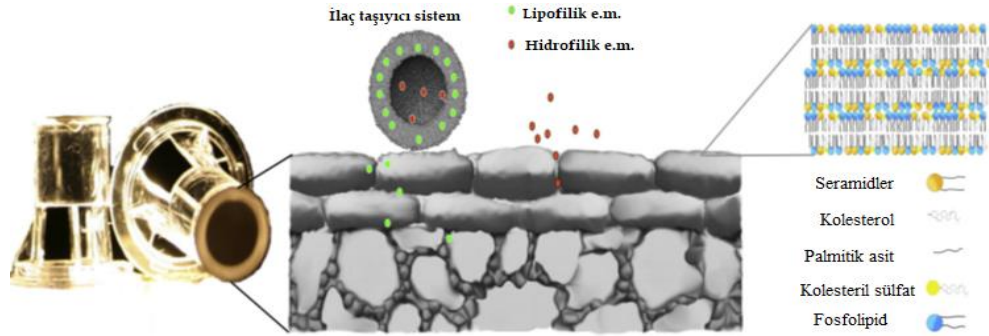
Bir başka çalışmada, lipozom formülasyonlarının diklofenak sodyumun deriden penetrasyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek için SC'yi taklit eden PVPA modeli kullanılmıştır. Diklofenak sodyum içeren geleneksel, deforme olabilen ve propilen glikol içeren lipozomların PVPA modelinden

permeasyonları incelenmiştir. PVPA_s ile yapılan permeasyon deneylerinden elde edilen sonuçlar ile, etken madde permeasyonunun lipit bileşiminden etkilendiği ve lipozomlar içerisindeki penetrasyon arttırıcılar ve kenar aktivatörlerinin varlığında beklendiği gibi arttığı gösterilmiştir [69].

Shakel ve ark. (2019), insan SC tabakasına yakın bir lipit bileşimine sahip PVPA bariyeri (PVPAsc) hazırlayarak kalsein permeasyonunu incelemişlerdir. Elde edilen verilerin, domuz kulağı modeli ile iyi bir korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca yeni PVPAsc modelinin -20 °C'de 2 haftaya kadar saklanabildiğini, pH 2.0 ila 8.0 aralığında ve DMSO, oleik asit ve Cremophor® gibi çözücülerin varlığında bütünlüğünü kaybetmeden kalabildiğini rapor etmişlerdir [70].

Moniz ve ark. (2020), nanopartiküllere yüklenmiş olan siklosporin A'nın deriden permeasyonunu incelemek amacıyla SC'un lipit yapısını taklit eden PVPAsc modelinin uygulanabilirliğini değerlendirmişlerdir. PVPAsc modelinin kullanım kolaylığı, tekrarlanabilirlik, uygun maliyet, nanopartiküllere yüklü halde bulunan etken maddenin permeasyonundaki farklılıkları tayin edebilme kapasitesi ve hayvan kullanımının azaltılmasını sağlaması gibi önemli avantajlar sunduğunu bildirmişlerdir [71].

Özetlenecek olursa deriyi taklit etmek amacıyla geliştirilen PVPA bariyerleri, farklı derecelerde lipofilisiteye ve penetrasyon potansiyeline sahip bileşiklerin permeasyonunun ve çeşitli penetrasyon arttırıcıların etkinliğinin değerlendirilmesi için kapsamlı olarak kullanılmaktadır [72]. Deri PVPA modellerinin, kullanım kolaylığı, verimlilik, maliyet ve uzun süreli saklama potansiyeli gibi özellikleri nedeniyle, erken ilaç geliştirme aşamasında önemli avantajlar sağladığı önerilmektedir [68].



Şekil 3. Stratum corneum'u taklit eden Fosfolipid Vezikül Esaslı Permeasyon Tayini (PVPA) modeli, bir selüloz ester filtre desteği üzerine lipozomların yerleştirilmesiyle elde edilen sıkı bir bariyerden oluşur [2].

Yeniden Yapılandırılmış İnsan Derisi Eşdeğerleri

Son yıllarda, etken maddelerin deriden permeasyon özelliklerinin incelenmesi amacıyla çeşitli doku kültürü temelli insan derisi modelleri geliştirilmiş ve ticari olarak piyasaya sürülmüştür [28].

Deriyi temsil eden ilk modeller, kutanöz iritasyon çalışmaları için tasarlanmıştır. Bu modellerde normal insan keratinositleri (NİK'leri), de-epidermize edilmiş dermiste büyütülmüştür [74]. Sonraki yıllarda destekleyici membranlar üzerinde NİK'lerinin büyütülmesiyle, yeniden yapılandırılmış insan epidermisi modellerinin gelişimi hız kazanmıştır [28]. Yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğerleri, yeniden yapılandırılmış insan epidermis eşdeğeri modelleri (örn. EpiSkin[®], SkinEthic[®], EpiDerm[®], LabSkin[®]) ve canlı deri eşdeğeri modelleri (GraftSkin[®], EpiDermFT[®], Pheninon[®]) olarak sınıflandırılmaktadır. Bu modeller, doku kültürü olarak üretilen insan hücreleri ve normalde deride bulunan matris eşdeğerlerinden oluşmaktadır [75, 76]. Yeniden yapılandırılmış insan epidermis modelleri, fototoksisite, korozivite ve iritasyon testlerinin yanı sıra permeasyon çalışmalarında da kullanılan faydalı araçlardır. Bu modeller aynı zamanda taşıyıcı bileşenlerinin optimizasyonu ve formülasyon tasarımında da kullanılmaktadır [28].

Yeniden Yapılandırılmış İnsan Epidermis Eşdeğeri Modelleri

Günümüzde, birçok yeniden yapılandırılmış insan epidermis eşdeğeri modeli ticari olarak mevcuttur. Bunlar ilaç ve kozmetik endüstrisinde hayvan derilerine alternatif olarak kullanılmaktadır. Bu modellerin bazıları iyi karakterize edilmiştir, morfolojik özellikleri ve epidermal lipit bileşimi açısından *ex vivo* insan derisi ile karşılaştırılmıştır [77]. Morfolojik olarak insan derisine benzer olmalarına rağmen, lipit organizasyonları normal deriden biraz farklıdır. İnsan derisinden farklı olarak, bu modeller kan damarları, kıl kökleri veya ter bezleri gibi yapılar içermemektedir. Bu nedenle, penetrasyon yolları sadece hücreler arası (interselüler) ve hücre içi (transselüler) yol ile sınırlıdır [28]. Piyasada bulunan üç model SkinEthic[®] (SkinEthic Laboratories, Nice, Fransa), EpiDerm[®] (MatTek Corporation, Ashland, MA, ABD) ve EpiSkin[®] (L'Ore'al, Paris, Fransa) (Şekil 4) deriden absorpsiyon çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır [76].

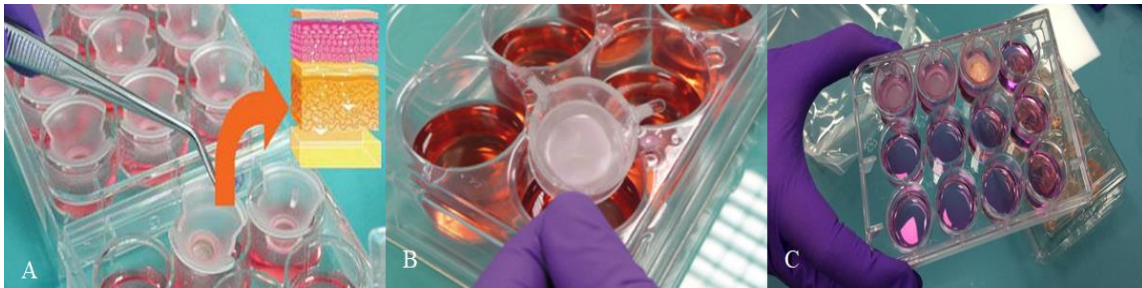
Ex vivo insan derisi modelleri ile karşılaştırıldığında, yeniden yapılandırılmış insan epidermis eşdeğerleri önemli ölçüde daha geçirgendir ancak permeabilite açısından oldukça değişken olan insan derisine kıyasla daha tekrarlanabilir sonuçlar vermektedir [76, 80]. Deri modelleri ile elde edilen verilerin tekrarlanabilir olması çok önemli bir avantajdır. Genel olarak, yeniden yapılandırılmış epidermis eşdeğeri modelleri kullanılarak yapılan permeasyon deneylerinden elde edilen sonuçlardaki vasyasyon, domuz derisi ve *ex vivo* insan derisi ile yapılan deneylere kıyasla daha düşüktür [81, 82]. Bu modellerin en önemli dezavantajları ise oldukça yüksek maliyetleridir [2].

Dreher ve ark. (2002), s/y emülsiyonu, y/s emülsiyonu, lipozomal dispersiyonu ve hidrojel gibi çeşitli taşıyıcı sistemler içine yüklenen kafein ve alfa-tokoferolün deriden permeasyonunu EpiDerm[®] ve EpiSkin[®] modellerini kullanılarak değerlendirmişler ve sonuçları *ex vivo* insan derisi ile kıyaslamışlardır. Birbirinden oldukça farklı fizikokimyasal özelliklere sahip iki etken maddenin permeasyon özelliklerinin, yeniden yapılandırılmış insan epidermis eşdeğeri modelleri ile doğru bir şekilde tahmin edilebildiğini ifade etmişlerdir [83]. Labouta ve ark. (2013), bu modellerin

nanopartiküllerin davranışını belirlemek ve insan derisine penetrasyon davranışlarını incelemek için uygun olabileceğini bildirmiştir [84]. Schäfer-Korting ve ark. (2008), EpiSkin[®], SkinEthic[®] ve EpiDerm[®] modellerinin, deriden etken madde penetrasyon – permeasyon çalışmalarında kullanmak için insan ve domuz derisine uygun alternatifler olduğu sonucuna varmışlardır. Bu modeller ve domuz derisi ile elde edilen permeasyon verilerinin, insan derisinden permeasyon sonuçlarını yansıttığını belirtmişlerdir [81].

Lotte ve ark. (2002) EpiDerm[®], EpiSkin[®] ve SkinEthic[®]'in seri içi ve seriler arası tekrar üretilebilirliğini araştırmışlardır. Bu amaçla, farklı fizikokimyasal özelliklere sahip üç bileşiğin (laurik asit, mannitol ve kafein) deriden permeasyonunu bu deri modelleri ile incelemişlerdir. Bütün deri modelleri için, seri içi tekrar üretilebilirlik seriler arası tekrar üretilebilirlikten daha yüksek bulunmuştur. Diğer taraftan, değerlendirilen üç bileşiğin deriden permeasyon sonuçları, *ex vivo* insan derisi ile beklendiği şekilde elde edilmiştir. Sonuç olarak, bu deri modellerinin perkütan absorpsiyonu değerlendirmek için umut verici olduğu ifade edilmiştir [85].

Deri modellerinin sadece deriden permeasyon ve penetrasyonu değil, metabolizasyona uğrayan etken maddeler için özellikle önem taşıyan ilaç metabolizmasını da tahmin etmesi önemlidir [86]. 1999 yılında yapılan bir çalışmada iki topikal glukokortikoid olan prednikarbat ve betametazon 17-valeratın penetrasyonu ve metabolizasyonu SkinEthic[®] modeli ile incelenmiştir. Yeniden yapılandırılmış insan epidermis eşdeğeri modelindeki esteraz aktivitesinin insan derisi ile korele olduğu ve glukokortikoidlerin metabolizasyonunun SkinEthic[®] modelinde iyi bir şekilde yansıtıldığı gösterilmiştir [80]. Mahmoud ve ark. (2005), SkinEthic[®] modelinde östradiol metabolizmasını araştırmışlar ve 17b-estradiolün, 17b-hidroksisteroid dehidrojenaz enzimi ile estrona metabolize edilmesinin insan derisine benzer şekilde olduğunu bulmuşlardır [88]. Testosteronun metabolizasyonu da yeniden yapılandırılmış epidermal bir model üzerinde araştırılmış ve normal insan derisinde olduğu gibi polar ve polar olmayan metabolitler rapor edilmiştir [89].



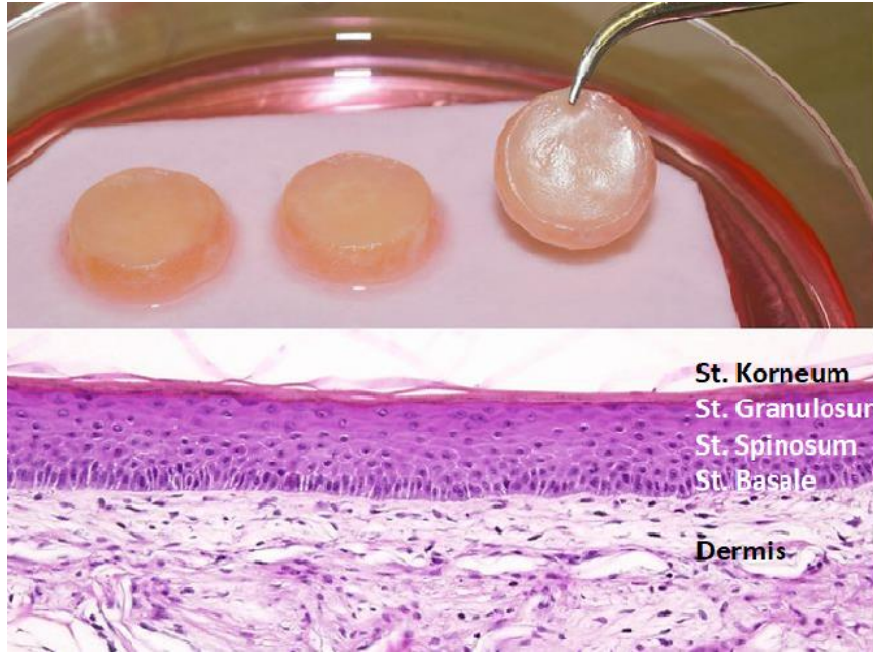
Şekil 4. EpiSkin[®] (A), SkinEthic[®] (B) ve EpiDerm[®] (C) modellerine ait görüntüler [71,72]

Çoğu araştırmacı, yeniden yapılandırılmış deri modellerinin, metabolizasyonun etken madde penetrasyonuna etkisini yeterince temsil eden uygun modeller olduğu sonucuna varmıştır.

Canlı Deri Eşdeğeri Modelleri

Canlı deri eşdeğeri modelleri, genellikle epidermis ve dermisten tabakalarından oluşur [90]. Bu modeller, keratinositler ve fibroblastlardan oluşur; bir epidermis ile insan derisi özelliklerine çok yakın morfoloji ve doku işlevselliği gösteren bir dermise sahiptir [91].

Canlı deri eşdeğeri modelleri; Phenion® *Full Thickness* Modeli (Şekil 5) (Phenion, Düsseldorf, Almanya); GraftSkin® (Apligraf; Organogenesis, MI, ABD); EpiDermFT® (MatTek Corporation, Ashland, MA, ABD) ve Vitrolife-Skin™ modeli (Kyoto, Japonya) ticari olarak piyasada bulunmaktadır [93]. Bu modeller daha çok yanık ve yaralanmalarda derinin yerini tutan (replacement) doku olarak kullanılırken, fototoksosite, korozivite ve deri iritasyon testleri ve transdermal permeasyon çalışmaları gibi alanlarda da değerlendirilmektedir [94]. Bu modeller *in vivo* koşullara daha iyi uyum göstermektedir.



Şekil 5. Phenion® *Full Thickness* modeline ait makroskobik ve histolojik görüntü [92]

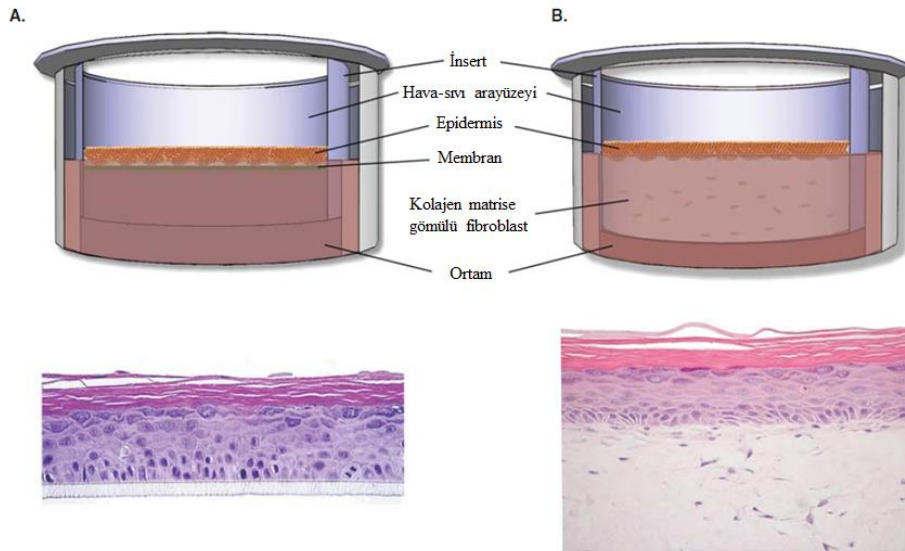
Phenion® FT modelinin bariyer fonksiyonu, dört bileşiğin permeasyonları ve gecikme süreleri incelenerek diğer deri modelleri ve domuz derisi ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak Phenion® FT modelinin, EpiDerm®, SkinEthic® ve EpiSkin®'e kıyasla benzoik asit, nikotin ve kafeine karşı biraz daha zayıf bir bariyer fonksiyonuna sahip olduğunu gösterirken, yüksek oranda lipofilik bir bileşik olan testosteronun permeasyonu bu spesifik modelde daha etkili bir şekilde gecikmiştir [81].

Özetlenecek olursa, yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğeri modellerinin insan derisi ve hayvan derisi için iyi alternatifler olabilmesini sağlayan avantajları şu şekilde sıralanabilir [28].

- Kullanıma hazır modellerdir, çok sayıda etken maddenin permeasyonunun kolay ve hızlı bir şekilde incelenmesini sağlamaktadır.

- Veri tekrarlanabilirliği yüksektir.
- Gecikme süresi kısa ve sabit olduğundan deneylerin 6 - 8 saat içinde gerçekleştirilmesine imkân verir. Sonsuz ve sonlu dozların test edilmesi mümkündür.
- Deri metabolizmasının değerlendirilmesinde kullanılabilir.
- Etkin maddelerin deriden penetrasyon / permeasyon davranışı üzerine ilaç taşıyıcı sistemlerin etkisini incelemeye olanak sağlar.

Yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğeri modellerinin bütün bu avantajlarına ve geliştirilmesindeki önemli adımlara rağmen, etkin maddelerin deriden absorpsiyonunun *in vivo* tahmini için insan veya hayvan derisinin yerini tamamen almaları henüz tam anlamıyla mümkün değildir. Yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğeri modellerin kullanımını sınırlayan en önemli faktörlerin başında maliyet gelmektedir. Ticari yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğeri modellerinin kullanıldığı permeasyon çalışmaları, tüysüz SKH-1 fareleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalardan en az iki kat daha maliyetlidir. Benzer şekilde, domuz derisi veya eksize edilmiş insan derisi yerine yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğeri modelleri kullanıldığında da, araştırma giderleri çok daha yüksek olmaktadır. Domuz derisinin mezbahalardan elde edilebilir olması ve insan derisinin de maliyetsiz olması avantaj iken, her zaman kolayca bulunabilir olmaması da önemli bir sorundur. Diğer taraftan, insan veya hayvan derisi ile çalışmak için etik kurul onayı alınması gereklidir. Yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğeri modelleri kullanılırken etik kurul izninin gerekmemesi de oldukça önemli bir avantajdır [28].



Şekil 6. (A) Epidermis ve (B) canlı deri eşdeğeri (tam kalınlıkta yeniden yapılandırılmış) modellerinin gösterimi ve histolojik görüntüleri [77,78]

Sonuç olarak, incelenen *in vitro* modellerin ve insan derisinin avantajları ve sınırlamaları Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Topikal formülasyonların optimizasyonu için kullanılan farklı deri modellerinin avantajları ve sınırlamaları [2,95].

Deri Modeli	Avantajları	Sınırlamalar
Silikon model membranlar	Tekrar üretilebilirlik/Tekrarlanabilirlik Düşük maliyet Uzun süreli depolama	Lipit esaslı değil SC'ye düşük benzerlik Biyolojik kökenli değil
PAMPA	Tekrar üretilebilirlik/Tekrarlanabilirlik Uzun süreli depolama Düşük maliyet	Sentetik lipitler / lipit esaslı değil Lipit organizasyonu karakterize edilmemiş / SC'ye düşük benzerlik Biyolojik kökenli değil
PVPA	Tekrar üretilebilirlik/Tekrarlanabilirlik Lipit bileşimi kolayca modifiye edilebilir Nispeten düşük maliyet Uzun süreli depolama	Lipid organizasyonu karakterize edilmemiş Biyolojik kökenli değil
Yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğerleri	İnsan derisine kıyasla permeasyon verilerinde tutarlılık	İnsan derisine kıyasla yüksek geçirgenlik Tartışmaya açık bariyer işlevi Yüksek maliyet
İnsan derisi	Altın standart model	Etik izinler Domuz kulağı derisine göre daha yüksek değişkenlik Farklı kaynaklar, yaş, cinsiyet, ırk, plastik cerrahi, amputasyon, kadavra Farklı anatomik kısımlar: abdominal, göğüs, sırt vb. Depolama zorluğu

SONUÇ VE TARTIŞMA

Moleküllerin deriden permeasyonunun belirlenmesi, dermal veya transdermal taşıyıcı sistemlerin değerlendirilmesinde önemli bir adımdır. Deriye uygulanması amaçlanan farmasötik ve kozmetik formülasyonların penetrasyon çalışmalarında, "altın standart" olarak kabul edilmesine rağmen, insan derisinin kullanımı her zaman mümkün olamamaktadır. İnsan derisinin her zaman ulaşılabilir olması genellikle zordur ve etik kaygılardan dolayı uygulamalarda birtakım kısıtlamaları içerir. Diğer taraftan, deney hayvanlarının kullanımında karşılaşılan bazı kısıtlayıcı faktörler de bulunmaktadır. Bu durum, alternatif *in vitro* deriden permeasyon modellerinin geliştirilmesi ve bu konuda yapılan çalışmaların artması sonucunu doğurmuştur.

Yapay membranlar; tekrar üretilebilirlik, düşük maliyet, kullanım kolaylığı, saklama koşulları ve modifiye edilebilir olması gibi birçok avantajı sebebiyle insan ve hayvan derisi yerine tercih edilmektedir. Yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğerleri ise; kullanıma hazır modeller olmaları,

yüksek veri tekrarlanabilirliğinin olması, etik kurul izni gerekmemesi ve deri metabolizmasının, deri korozyonunun ve fototoksitenin değerlendirilmesinde kullanılabilir olmaları gibi avantajları nedeniyle önemli hayvan derisi alternatifleri olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğerlerinin, düşük bariyer fonksiyonları ve yüksek maliyetleri nedeniyle, permeasyon çalışmalarında hayvan veya insan derisinin yerini tamamen alıp alamayacağı halen tartışmalıdır. Standart hale getirilmesi kolay, yüksek tekrarlanabilirliğe sahip, ilaç keşfinin erken aşamalarında ve kozmetik araştırmalarda deriden etken madde penetrasyonunu tahmin etmeye yönelik ve geleneksel yaklaşımlara alternatif olabilecek *in vitro* deri modellerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar büyük önem taşımaktadır.

YAZAR KATKILARI

Kavram: F.U.B., Ö.Y.; Tasarım: F.U.B.; Denetim: F.U.B.; Kaynaklar: F.U.B., Ö.Y.; Malzemeler: Ö.Y., F.U.B.; Veri Toplama ve/veya işleme: Ö.Y., F.U.B.; Analiz ve/veya yorumlama: F.U.B., Ö.Y.; Literatür taraması: Ö.Y., F.U.B.; Makalenin yazılması: Ö.Y., F.U.B.; Kritik inceleme: F.U.B.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

1. Lam, P.L., Gambari, R., (2014). Advanced progress of microencapsulation technologies: *in vivo* and *in vitro* models for studying oral and transdermal drug deliveries. *Journal of Controlled Release*, 178, 25–45. [CrossRef]
2. Flaten, G. E., Palac, Z., Engesland, A., Filipović-Grčić, J., Vanić, Ž., Škalko-Basnet, N. (2015). *In vitro* skin models as a tool in optimization of drug formulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75, 10-24. [CrossRef]
3. Franz, T. J. (1975). Percutaneous absorption. On the relevance of *in vitro* data. *Journal of Investigative Dermatology*, 64(3), 190-195. [CrossRef]
4. Barbero, A. M., Frasc, H. F. (2009). Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: a quantitative review. *Toxicology In Vitro*, 23(1), 1-13. [CrossRef]
5. Semlin, L., Schäfer-Korting, M., Borelli, C., Korting, H. C. (2011). *In vitro* models for human skin disease. *Drug Discovery Today*, 16(3-4), 132-139. [CrossRef]

6. Schmoock, F.P., Meingassner, J.G., Billich, A., (2001). Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *International Journal of Pharmaceutics*, 215, 51–56. [CrossRef]
7. Vallet, V., Cruz, C., Josse, D., Bazire, A., Lallement, G., Boudry, I., (2007). *In vitro* percutaneous penetration of organophosphorus compounds using full-thickness and splitthickness pig and human skin. *Toxicology In Vitro*, 21, 1182–1190. [CrossRef]
8. Luo, L., Patel, A., Sinko, B., Bell, M., Wibawa, J., Hadgraft, J., Lane, M.E. (2016). A comparative study of the *in vitro* permeation of ibuprofen in mammalian skin, the PAMPA model and silicone membrane. *International Journal of Pharmaceutics*, 505, 14–19. [CrossRef]
9. Yoshimatsu, H., Ishii, K., Konno, Y., Satsukawa, M., Yamashita, S. (2017). Prediction of human percutaneous absorption from *in vitro* and *in vivo* animal experiments. *International Journal of Pharmaceutics*, 534, 348–355. [CrossRef]
10. Badıllı, U., Tuba Şengel-Türk, C., Amasya, G., Tarımcı, N. (2017). Novel drug delivery system for dermal uptake of etofenamate: Semisolid SLN dispersion. *Current Drug Delivery*, 14(3), 386-393. [CrossRef]
11. Gümüştas, M., Tuba Şengel-Türk, C., Badıllı, U., Amasya, G., Özkan, S. A., Tarımcı, N. (2017). Optimization of stability indicating LC method for the sensitive in vitro determination from Solid Lipid Nanoparticles and ex vivo analysis from rat skin of etofenamate. *Current Pharmaceutical Analysis*, 13(1), 63-71. [CrossRef]
12. Amasya, G., Gümüştas, M., Badıllı, U., Özkan, S. A., Tarımcı, N. (2018). Development of a HILIC method for the determination of 5-fluorouracil from nano drug delivery systems and rat skin extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 154, 285-293. [CrossRef]
13. Amasya, G., Aksu, B., Badıllı, U., Onay-Beşikçi, A., Tarımcı, N. (2019). QbD guided early pharmaceutical development study: production of lipid nanoparticles by high pressure homogenization for skin cancer treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, 563, 110-121. [CrossRef]
14. Kumar, P., Singh, S. K., Mishra, D. N., Girotra, P. (2015). Enhancement of ketorolac tromethamine permeability through rat skin using penetration enhancers: An ex-vivo study. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 5(3), 142. [CrossRef]
15. MacNeil, S. (2007). Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*, 445(7130), 874-880. [CrossRef]
16. European Commission. (2003). Draft of technical guidance document. 2nd ed. European Chemicals Bureau
17. EMA-CHMP. Draft Guideline on Quality and Equivalence of Topical Products. European Medicines Agency; Amsterdam, The Netherlands: (2018). s. 1–36. Erişim: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-quality-equivalence-topical-products_en.pdf. Erişim Tarihi: 12.03.2021

18. Hadgraft, J. (2001). Skin, the final frontier. *International Journal of Pharmaceutics*, 224, 1–18. [\[CrossRef\]](#)
19. Montagna W, Parakkal PF. (2012) The Structure and Function of Skin. 3rd ed. New York: Academic Press
20. Roberts MS, Cross SE, Pellett MA, Walters KA. (2002). Skin transport. In: Walters KA, Editor. *Dermatological and Transdermal Formulations*, (pp. 89–196). New York: Marcel Dekker.
21. Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., Wolf, R. (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology*, 30, 257–262. [\[CrossRef\]](#)
22. Menon, G.K., Cleary, G.W., Lane, M.E. (2012). The structure and function of the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics*, 435, 3–9. [\[CrossRef\]](#)
23. Andrews, S.N., Jeong, E., Prausnitz, M.R. (2013). Transdermal delivery of molecules is limited by full epidermis, not just stratum corneum. *Pharmaceutical Research*, 30, 1099–1109. [\[CrossRef\]](#)
24. Bolzinger, M.-A., Briçon, S., Pelletier, J., Chevalier, Y. (2012). Penetration of drugs through skin, a complex-rate controlling membrane. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 17, 156–165. [\[CrossRef\]](#)
25. Schaefer, U.F., Hansen, S., Schneider, M., Luengo Contreras, J., Lehr, C.M. (2008). Models for skin absorption and skin toxicity testing. In: Kim, K., Ehrhardt, K.-J. (Eds.), *Drug Absorption Studies*, (pp. 3–33). New York: Springer.
26. Chittenden, J.T., Brooks, J.D., Riviere, J.E. (2014). Development of a mixed-effect pharmacokinetic model for vehicle modulated *in vitro* transdermal flux of topically applied penetrants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103, 1002–1012. [\[CrossRef\]](#)
27. Souto, E.B. (2005). PhD Thesis. SLN and NLC for Topical Delivery of Antifungals. Institut of Pharmacy, Freie Universität, Berlin.
28. Van Gele, M., Geusens, B., Brochez, L., Speckaert, R., Lambert, J. (2011). Three-dimensional skin models as tools for transdermal drug delivery: challenges and limitations. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8(6), 705-720. [\[CrossRef\]](#)
29. Oliveira, G., Beezer, A.E., Hadgraft, J., Lane, M.E. (2011). Alcohol enhanced permeation in model membranes. Part II. Thermodynamic analysis of membrane partitioning. *International Journal of Pharmaceutics*, 420, 216–222. [\[CrossRef\]](#)
30. Oliveira, G., Hadgraft, J., Lane, M. E. (2012). The influence of volatile solvents on transport across model membranes and human skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 435(1), 38-49. [\[CrossRef\]](#)
31. de Jager, M., Groenink, W., Bielsa, I., Guivernau, R., Andersson, E., Angelova, N., Ponc, M., Bouwstra, J. (2006). A novel *in vitro* percutaneous penetration model: evaluation of barrier properties with p-aminobenzoic acid and two of its derivatives. *Pharmaceutical Research*, 23, 951–960. [\[CrossRef\]](#)

32. Albery, W.J., Burke, J.F., Leffler, E.B., Hadgraft, J. (1976). Interfacial transfer studied with a rotating diffusion cell. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1* 72, 1618–1626. 27 Nisan 2021’de alındı, <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1976/F1/F19767201618>
33. Guy, R.H., Fleming, R. (1979). The estimation of diffusion coefficients using the rotating diffusion cell. *International Journal of Pharmaceutics*, 3, 143–149. [[CrossRef](#)]
34. Dias, M., Hadgraft, J., Lane, M.E. (2007). Influence of membrane-solvent-solute interactions on solute permeation in model membranes. *International Journal of Pharmaceutics*, 336(1), 108–114. [[CrossRef](#)]
35. Santos, P., Machado, M., Watkinson, A.C., Hadgraft, J., Lane, M.E. (2009). The effect of drug concentration on solvent activity in silicone membranes. *International Journal of Pharmaceutics*, 377(1–2), 70–75. [[CrossRef](#)]
36. Oliveira, G., Hadgraft, J., Lane, M.E. (2012). The role of vehicle interactions on permeation of an active through model membranes and human skin. *International Journal of Cosmetic Science*, 34, 536–545. [[CrossRef](#)]
37. Ng, S. F., Rouse, J. J., Sanderson, F. D., Eccleston, G. M. (2012). The relevance of polymeric synthetic membranes in topical formulation assessment and drug diffusion study. *Archives of Pharmacal Research*, 35(4), 579-593. [[CrossRef](#)]
38. Ng, S. F., Rouse, J., Sanderson, D., Eccleston, G. (2010). A comparative study of transmembrane diffusion and permeation of ibuprofen across synthetic membranes using Franz diffusion cells. *Pharmaceutics*, 2(2), 209-223. [[CrossRef](#)]
39. Loftsson, T., Konradsdottir, F., Masson, M. (2006). Development and evaluation of an artificial membrane for determination of drug availability. *International Journal of Pharmaceutics*, 326, 60–68. [[CrossRef](#)]
40. Oliveira, G., Beezer, A.E., Hadgraft, J., Lane, M.E. (2010). Alcohol enhanced permeation in model membranes. Part I. Thermodynamic and kinetic analyses of membrane permeation. *International Journal of Pharmaceutics*, 393, 61–67. [[CrossRef](#)]
41. Ottaviani, G., Martel, S., Carrupt, P.A. (2006). Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49, 3948–3954. [[CrossRef](#)]
42. Nakano, M., Patel, N. K. (1970). Release, uptake, and permeation behavior of salicylic acid in ointment bases. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 59(7), 985-988. [[CrossRef](#)]
43. Watkinson, R.M., Guy, R.H., Hadgraft, J., Lane, M.E. (2009). Optimisation of cosolvent concentration for topical drug delivery II: influence of propylene glycol on ibuprofen permeation. *Skin Pharmacology and Physiology*, 22, 225–230. [[CrossRef](#)]
44. Watkinson, R.M., Herkenne, C., Guy, R.H., Hadgraft, J., Oliveira, G., Lane, M.E. (2009). Influence of ethanol on the solubility, ionization and permeation characteristics of ibuprofen in silicone and human skin. *Skin Pharmacology and Physiology*, 22, 15–21. [[CrossRef](#)]

45. Watkinson, R.M., Guy, R.H., Oliveira, G., Hadgraft, J., Lane, M.E., (2011). Optimisation of cosolvent concentration for topical drug delivery III – influence of lipophilic vehicles on ibuprofen permeation. *Skin Pharmacology and Physiology*, 24, 22–26. [CrossRef]
46. Miki, R., Ichitsuka, Y., Yamada, T., Kimura, S., Egawa, Y., Seki, T., Juni, K., Ueda, H., Morimoto, Y., (2015). Development of a membrane impregnated with a poly(dimethylsiloxane)/poly(ethylene glycol) copolymer for a highthroughput screening of the permeability of drugs, cosmetics, and other chemicals across the human skin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66, 41–49. [CrossRef]
47. Joshi, V., Brewster, D., Colonerio, P., (2012). Transdermal diffusion. *In vitro* diffusion studies in transdermal research: a synthetic membrane model in place of human skin. *Drug Development and Delivery*, 12, 40–42. 10 Haziran, 2021’de alındı, <https://drug-dev.com/in-vitro-diffusion-studies-in-transdermal-research-a-synthetic-membrane-model-in-place-of-human-skin/>
48. Merck. (2012). Millipore. Strat-MTM Membrane: A Synthetic Transdermal Diffusion Test Model. Millipore Corporation, Darmstadt, German. Erişim: http://www.in-cosmetics.com/__novadocuments/61173?v=635459653141970000. Erişim Tarihi: 12.03.2021
49. Haq, A., Goodyear, B., Ameen, D., Joshi, V., Michniak-Kohn, B. (2018). Strat-M® synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 547(1-2), 432-437. [CrossRef]
50. Kaur, L., Singh, K., Paul, S., Singh, S., Singh, S., Jain, S. K. (2018). A mechanistic study to determine the structural similarities between artificial membrane Strat-M™ and biological membranes and its application to carry out skin permeation study of amphotericin B nanoformulations. *AAPS Pharmscitech*, 19(4), 1606-1624. [CrossRef]
51. Simon, A., Amaro, M. I., Healy, A. M., Cabral, L. M., de Sousa, V. P. (2016). Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with *in vivo-in vitro* correlation. *International Journal of Pharmaceutics*, 512(1), 234-241. [CrossRef]
52. Uchida, T., Kadhum, W. R., Kanai, S., Todo, H., Oshizaka, T., Sugibayashi, K. (2015). Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M™. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67, 113-118. [CrossRef]
53. Kansy, M., Senner, F., Gubernator, K. (1998). Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41(7), 1007-1010. [CrossRef]
54. Faller, B. (2008). Artificial membrane assays to assess permeability. *Current Drug Metabolism*, 9(9), 886-892. [CrossRef]
55. Bujard, A., Sol, M., Carrupt, P.-A., Martel, S. (2014). Predicting both passive intestinal absorption and the dissociation constant toward albumin using the PAMPA technique. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63, 36–44. [CrossRef]
56. Di, L., Kerns, E.H., Bezar, I.F., Petusky, S.L., Huang, Y. (2009). Comparison of blood–brain barrier permeability assays: *in situ* brain perfusion, MDR1-MDCKII and PAMPA-BBB. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98, 1980–1991. [CrossRef]

57. Sinko, B., Kokosi, J., Avdeef, A., Takacs-Novak, K. (2009). A PAMPA study of the permeability-enhancing effect of new ceramide analogues. *Chemistry and Biodiversity*, 6, 1867–1874. [CrossRef]
58. Sinko, B., Garrigues, T.M., Balogh, G.T., Nagy, Z.K., Tsinman, O., Avdeef, A., Takacs-Novak, K. (2012). Skin-PAMPA: a new method for fast prediction of skin penetration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45, 698–707. [CrossRef]
59. Tsinman, K., Sinko, B. (2013). A high throughput method to predict skin penetration and screen topical formulations. *Cosmetic Toiletries*, 128, 192–199. 1 Mayıs 2021’de alındı, <https://www.cosmeticsandtoiletries.com/testing/invivo/premium-A-High-Throughput-Method-to-Predict-Skin-Penetration-and-Screen-Topical-Formulations-201519931.html>
60. Vizserálek, G., Berkó, S., Tóth, G., Balogh, R., Budai-Szűcs, M., Csányi, E., Sinkó, B., Takács-Novák, K. (2015). Permeability test for transdermal and local therapeutic patches using Skin PAMPA method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76, 165–172. [CrossRef]
61. Balazs, B., Vizserálek, G., Berkó, S., Budai-Szűcs, M., Kelemen, A., Sinkó, B., Takács-Novák, K., Szabó-Révész, P., Csányi, E. (2016). Investigation of the efficacy of transdermal penetration enhancers through the use of human skin and a skin mimic artificial membrane. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105, 1134–1140. [CrossRef]
62. Karadzovska, D., Riviere, J.E. (2013). Assessing vehicle effects on skin absorption using artificial membrane assays. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50, 569–576. [CrossRef]
63. Zhang, Y., Lane, M. E., Hadgraft, J., Heinrich, M., Chen, T., Lian, G., Sinko, B. (2019). A comparison of the *in vitro* permeation of niacinamide in mammalian skin and in the Parallel Artificial Membrane Permeation Assay (PAMPA) model. *International Journal of Pharmaceutics*, 556, 142-149. [CrossRef]
64. Kerns, E. H., Di, L., Petusky, S., Farris, M., Ley, R., Jupp, P. (2004). Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(6), 1440-1453. [CrossRef]
65. Avdeef, A. (2005). The rise of PAMPA. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 1(2), 325-342. [CrossRef]
66. Flaten, G.E., Bunjes, H., Luthman, K., Brandl, M. (2006). Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier 2. Characterization of barrier structure, storage stability and stability towards pH changes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28, 336– 343. [CrossRef]
67. Flaten, G.E., Awoyemi, O., Luthman, K., Brandl, M., Massing, U. (2009). The Phospholipid Vesicle-based Permeability Assay: 5. Development Towards an Automated Procedure for High Throughput Permeability Screening. *JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation*, s. 12–21. [CrossRef]
68. Engesland, A., Skar, M., Hansen, T., Škalko-Basnet, N., Flaten, G.E. (2013). New applications of phospholipid vesicle-based permeation assay: permeation model mimicking skin barrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102, 1588–1600. [CrossRef]

69. Palac, Z., Engesland, A., Flaten, G.E., Škalko-Basnet, N., Filipovic' - Grčić, J., Vanic', Z'. (2014). Liposomes for (trans)dermal drug delivery: the skin-PVPA as a novel *in vitro* stratum corneum model in formulation development. *Journal of Liposome Research*, 24, 313–322. [CrossRef]
70. Shakel, Z., Nunes, C., Lima, S. A. C., Reis, S. (2019). Development of a novel human stratum corneum model, as a tool in the optimization of drug formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 569, 118571. [CrossRef]
71. Moniz, T., Lima, S. A. C., Reis, S. (2020). Application of the Human stratum corneum lipid-based mimetic model in assessment of drug-loaded nanoparticles for skin administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 591, 119960. [CrossRef]
72. Ma, M., Di, H. J., Zhang, H., Yao, J. H., Dong, J., Yan, G. J., Chen, J. (2017). Development of phospholipid vesicle-based permeation assay models capable of evaluating percutaneous penetration enhancing effect. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43 (12), 2055-2063. [CrossRef]
73. Engesland, A., Škalko-Basnet, N., Flaten, G.E. (2015). PVPA and EpiSkin® in assessment of drug therapies destined for skin administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104 (3), 1119–1127. [CrossRef]
74. Ponec, M. (1992). *In vitro* cultured human skin cells as alternatives to animals for skin irritancy screening. *International Journal of Cosmetic Science*, 14 (6), 245-264. [CrossRef]
75. Godin, B., Touitou, E. (2007). Transdermal skin delivery: predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 1152–1161. [CrossRef]
76. Netzlaff, F., Lehr, C.-M., Wertz, P.W., Schaefer, U.F., (2005). The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60, 167–178. [CrossRef]
77. Ponec, M., Boelsma, E., Gibbs, S., Mommaas, M. (2002). Characterization of reconstructed skin models. *Skin Pharmacology and Physiology*, 15 (Suppl. 1), 4-17. [CrossRef]
78. Episkin Laboratories. Erişim: <https://www.episkin.com/SkinEthic-RHE> Erişim Tarihi: 10.03.2021.
79. MatTek Laboratories Erişim: <https://www.mattek.com/products/epidermft/> Erişim Tarihi: 10.03.2021.
80. Netzlaff, F., Schaefer, U.F., Lehr, C.-M., Meiers, P., Stahl, J., Kietzmann, M., Niedorf, F., (2006). Comparison of bovine udder skin with human and porcine skin in percutaneous permeation experiments. *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*, 34, 499–513. 9 Mayıs 2021'de alındı, https://www.researchgate.net/publication/6677538_Comparison_of_bovine_udder_skin_with_human_and_porcine_skin_in_percutaneous_permeation_experiments
81. Schäfer-Korting M, Bock U, Diembeck W. (2008). The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: results of the validation study. *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*, 36 (2), 161–187. [CrossRef]

82. Schäfer-Korting M, Bock U, Gamer A. (2006). Reconstructed human epidermis for skin absorption testing: results of the German prevalidation study. *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*, 34, 283-94. [CrossRef]
83. Dreher, F., Fouchard, F., Patouillet, C., Andrian, M., Simonnet, J. T., Benech-Kieffer, F. (2002). Comparison of cutaneous bioavailability of cosmetic preparations containing caffeine or α -tocopherol applied on human skin models or human skin *ex vivo* at finite doses. *Skin Pharmacology and Physiology*, 15(Suppl. 1), 40-58. [CrossRef]
84. Labouta, H.I., Thude, S., Schneider, M. (2013). Setup for investigating gold nanoparticle penetration through reconstructed skin and comparison to published human skin data. *Journal of Biomedical Optics*, 18, 061218. [CrossRef]
85. Lotte, C., Patouillet, C., Zanini, M., Messenger, A., Roguet, R. (2002). Permeation and skin absorption: reproducibility of various industrial reconstructed human skin models. *Skin Pharmacology and Physiology*, 15(Suppl. 1), 18-30. [CrossRef]
86. Bando, H., Mohri, S., Yamashita, F., Takakura, Y., Hashida, M. (1997). Effects of skin metabolism on percutaneous penetration of lipophilic drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86 (6), 759-761. [CrossRef]
87. Gysler, A., Kleuser, B., Sippl, W., Lange, K., Korting, H. C., Hölting, H. D., Schäfer-Korting, M. (1999). Skin penetration and metabolism of topical glucocorticoids in reconstructed epidermis and in excised human skin. *Pharmaceutical Research*, 16(9), 1386-1391. [CrossRef]
88. Mahmoud, A., Haberland, A., Dürrfeld, M., Heydeck, D., Wagner, S., Schäfer-Korting, M. (2005). Cutaneous estradiol permeation, penetration and metabolism in pig and man. *Skin Pharmacology and Physiology*, 18(1), 27-35. [CrossRef]
89. Slivka, S. R. (1992). Testosterone metabolism in an *in vitro* skin model. *Cell Biology and Toxicology*, 8(4), 267-276. [CrossRef]
90. Planz, V., Lehr, C. M., Windbergs, M. (2016). *In vitro* models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 242, 89-104. [CrossRef]
91. Ackermann, K., Borgia, S. L., Korting, H. C., Mewes, K. R., Schäfer-Korting, M. (2010). The Phenion® full-thickness skin model for percutaneous absorption testing. *Skin Pharmacology and Physiology*, 23(2), 105-112. [CrossRef]
92. Henkel Laboratories Erişim: <https://www.phenion.com/products/reconstructed-tissues> Erişim Tarihi: 11.03.2021.
93. De Wecer, B., Petersohn, D., Mewes, K. R. (2013). Overview of human three-dimensional (3D) skin models used for dermal toxicity assessment. *HPC Today*, 8, 18-22. 2 Mayıs 2021'de alındı, https://www.teknoscienze.com/Contents/Riviste/PDF/tutto_HPC1_2013_RGB_20-25.pdf
94. Neupane, R., Boddu, S. H., Renukuntla, J., Babu, R. J., Tiwari, A. K. (2020). Alternatives to biological skin in permeation studies. *Current Trends and Possibilities. Pharmaceutics*, 12(2), 152. [CrossRef]

95. Abd, E., Yousef, S. A., Pastore, M. N., Telaprolu, K., Mohammed, Y. H., Namjoshi, S., Roberts, M. S. (2016). Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, 8, 163. [\[CrossRef\]](#)



KARBONMONOKSİT ZEHİRLENMELERİNDE POSTMORTEM DEĞİŞİKLİKLER

POSTMORTEM CHANGES IN CARBON MONOXIDE POISONING

Ayşegül KOÇYİĞİT , Benay CAN EKE* 

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı, 06560, Ankara,
Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada karbonmonoksit gazı ile zehirlenme sonucu görülen ölümlerde postmortem değişikliklerin derlenmesi amaçlanmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Karbonmonoksit zehirlenmesi sonucu cilt yüzeyinin spesifik bir kırmızı renk alması en karakteristik özellik olarak belirtilmiştir. Genel olarak, COHb konsantrasyonları % 30'u aştığında ortaya çıkmaktadır. Otopsi, COHb ve COMb oluşumuyla benzer spesifik kırmızı renge sahip kan, organ ve kasları ortaya çıkarmaktadır. Akciğer ödemi ve genelleşmiş organ tıkanıklığı da gözlenmektedir. CO zehirlenmesinin semptomları ve otopsi bulguları nonspesifik olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle kanda COHb saptanması ile teşhis konulması önemlidir. CO maruziyeti, % COHb'nin% 10-50 olduğu ölümlerde katkıda bulunan bir faktör olabileceği görülmüştür. Bu çalışmada incelediğimiz kaynaklara göre, kan, kas, beyin, akciğer ve böbrek gibi dokuların, ölümcül CO'ya maruz kalma nedeniyle ölüm teşhisi için en uygun dokular olduğu ve bunun için kullanılabilmesi görülmüştür. Mevsimsel olarak soba kullanımı ve gribal enfeksiyonların yaygın olması ile daha çok kış aylarında bu şikayetlerle başvuran hastalar detaylı sorgulanmalı ve tanı koymada geç kalmanın sonucunda ölüm olabileceği unutulmamalıdır.

Anahtar Kelimeler: Karbonmonoksit, zehirlenme, postmortem

ABSTRACT

Objective: In this study, it was aimed to review postmortem changes in deaths caused by carbon monoxide poisoning.

Result and Discussion: It has been stated that the most characteristic feature of carbon monoxide poisoning is that it causes a specific red color of the skin surface. In general, it occurs when COHb concentrations exceed 30%. Autopsy reveals blood, organs, and muscles with a cherry red color similar to the formation of COHb and COMb. There is also generalized organ obstruction and pulmonary edema. Symptoms and autopsy findings of CO poisoning emerge as non-specific. Therefore, detecting COHb in the blood is essential for diagnosing. CO exposure has been shown to be a contributing factor in deaths where % COHb is 10-50%. According to the sources we examined in this study, it has been observed that tissues such as muscle,

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Benay Can Eke
e-posta / e-mail: eke@pharmacy.ankara.edu.tr, Tel. / Phone: +90 312 203 3115

blood, lung, brain, and kidney are the most appropriate tissues for the diagnosis of death due to exposure to fatal CO and can be used for this. Because of the seasonal use of stoves and the prevalence of influenza infections, patients who report these symptoms mostly in the winter months should be examined closely. It should be kept in mind that delayed diagnosis may result in death.

Keywords: Carbon monoxide, poisoning, postmortem

GİRİŞ

Karbonmonoksit (CO), organik bileşiklerin tam olmayan yanması sonucu ortaya çıkan, iritan olmayan, renksiz, kokusuz ve tatsız gaz formundadır. CO zehirlenmeleri gündelik hayatta en çok karşılaşılan zehirlenmelerden olup, intihar amaçlı veya kaza olarak ölümle sonuçlanan zehirlenmeler arasında ilk sıralardadır. Karbonmonoksit zehirlenmesini dönemsel hastalıklardan ayırt etmek ve tanı koymak oldukça güçtür [1,2].

CO, organik bileşik içeren yakıtların tam yanmaması sonucu ortaya çıkmaktadır [3]. CO; soba, kombi, şofben, odun, şömine, diğer yakıtlar ve kömür kullanılmakta olan sistemlerde maddelerin tamamen yanmamasından veya havalandırılması iyi olmayan ortamlarda jeneratörlerin ve motorlu araçların egzoz dumanından ortaya çıkabilmektedir. Öte yandan doğal gaz kullanmakta olan araçlar, tiner, sprey boyalar ve yangın CO zehirlenmesine yol açabilmektedir [4].

Ülkemizde CO zehirlenmeleri çoğunlukla soba ve şofben gibi ısıtma amaçlı kullanılmakta olan sistemler nedeniyle oluşmaktadır ve intihar vakaları nadir görülmektedir [5]. Gelişmiş ülkelerde ise CO zehirlenmeleri sanayi ve egzoz gazları kaynaklı görülmektedir. İntihar amaçlı karşılaşılan CO zehirlenmeleri sonucunda ölüm vakaları daha yaygın görülmektedir [6,7]. Ülkemizin bazı bölgelerinde yapılan araştırmalarda zehirlenme kaynakları içerisinde en sık gözlenenler soba ve şofben olarak bildirilmiştir [5,8,9].

Tarihçe

1857 yılında ilk kez Claude Bernard, doku hipoksisi ile ortaya çıkan toksik etkileri açıklamıştır. 1865 yılında ise Klebs, CO'e maruziyeti sonucu ratlarda görülen patolojik ve klinik bulguları tanımlamıştır. Haldane ise 1895 yılında CO toksisite mekanizmasını açıklamıştır [10,11]. 1924 yılında Pineas tarafından globus pallidus da klasik bilateral lezyonlar ve diffuz subkortikal demiyelinizasyon açıklanan ve 1925 yılında ise Grinker tarafından parkinsonizm ile CO zehirlenmesi ilişkilendirilmiştir. Haldane tarafından ortaya çıkarılan toksisite-hipoksi teorisini destekleyecek şekilde köpeklerde yapılan deneyde CO toksisitesinin hücresel düzeyde olduğunu Goldbaum ve arkadaşları 1976 yılında belirtmişlerdir [10,12].

CO Toksikokinetiği

CO oda sıcaklığında gaz halde bulunur ve akciğerlerden solunarak kan dolaşımına geçer. CO'nun hemoglobine (Hb) afinitesi, oksijenden 200-300 kat fazla olduğundan, eritrositlerde karboksihemoglobin (COHb) oluşur. Kandaki COHb, solunan CO konsantrasyonu, CO maruziyet

süresi, pulmoner ventilasyon, egzersiz ve sağlık durumu gibi çok çeşitli faktörlere bağlı oluşmaktadır [11, 12, 13]. İn vivo olarak hem protein yıkımı ile az miktarda CO üretilmektedir [12]. İnhalasyondan sonra CO neredeyse tamamen oksitlenmemiş halde kalır ve solunan CO'nin %0.1'den azı karbondioksit dönüşür [14].

Karbonmonoksit, hemoglobine hızlı bir şekilde bağlanır ve Hb'deki O₂ ile hızlı yer değiştirmesi sonucunda COHb oluşmaktadır. COHb, kanın O₂ taşıma hacmini azaltarak doku hipoksisine neden olmaktadır. Oksijen bağlanma bölgelerinde COHb, O₂'ye yüksek affinite göstermektedir ve bu bölgelerde bağlanan O₂ dokulara iletilmemektedir. Bu artmış affinite Haldane etkisi olarak adlandırılmaktadır. Haldane etkisi, O₂'in dokularda Hb'den ayrılmasını zorlaştırmaktadır [15]. COHb oluşumu; CO'in konsantrasyonu, maruziyet süresi ve alveolar ventilasyona bağlı olarak değişmektedir. CO toksisite sebebi olarak, CO'in Hb için oksijenle yarışı olduğu düşünülse de, ana mekanizmanın hücresel düzeyde direct CO hasarı ve doku hipoksisi kombinasyonu olduğu düşünülmektedir [16].

CO ile Hb bağlanması geri dönüşlüdür ve vücuda alınan CO'in oda havasında yarılanma süresinin yaklaşık 320 dakika olduğu bilinmektedir. Bu yarılanma süresi %100 O₂ ile 90 dakikaya ve 3 atmosfer basıncında ise %100 O₂ ile 23 dakikaya düşürülebilmektedir. Atmosferdeki %1'lik konsantrasyonda bulunan CO takriben 10 dakika içerisinde ölüme yol açabilmektedir. Aktif bireyler, yaşlı hastalar ve çocuklar daha hızlı etkilenmekte olup, stres, anemi ve egzersiz yatkınlığı arttırmaktadır. Atmosferdeki yüksek konsantrasyon ve maruziyet süresinin uzun olması göz önünde bulundurulması gereken önemli faktörlerdendir. Oksijen ihtiyacının yüksek olması beyin, kalp ve böbrekleri CO zehirlenmesinin hipoksik etkilerine karşı hassas hale getirmektedir. CO zehirlenmesindeki semptomların bir çoğundan santral sinir sistemi (SSS) tutulması sorumlu bulunmaktadır [14,17].

CO inhale edildiğinde vücutta iki durum oluşmaktadır; Doku hipoksisi ve inflamatuvar ve immünolojik etki ile direkt hücre hasarı [18]. CO'in Hb'e afinitesi O₂'den 200-300 kat daha fazladır. Hb'e bağlanan CO, COHb oluşturur. Oksijen dağılımının bozulması ile öncelikle oksijene en ihtiyaç duyan organlar olan beyin ve kalp dokusunda hipoksi meydana gelmektedir. Hipoksinin şiddetine göre belirtiler ortaya çıkmaya başlamaktadır. CO zehirlenmesinin direkt toksik etkisi sonucunda hem grubu taşıyan proteinler (miyoglobin, guanilsiklaz, sitokromlar) etkilenmektedir. Bunlar sonucunda ise rabdomyoliz, laktik asidoz ve hücre nekrozu gözlenmektedir [19, 20].

Karbonmonoksit zehirlenmesindeki patofizyolojik temel tam açık olmamakla beraber son zamanlarda çalışmalar CO'in sebep olduğu toksisitede farklı mekanizmaların rol aldığını düşündürmektedir. Bu mekanizmalardan biri CO'in neden olduğu hipoksiye ilaveten reoksijenizasyon süreci ile SSS'de meydana gelen hasardır. Hiperoksijenizasyon ise parsiyel redükte oksijen radikallerinin oluşumuna neden olmakta ve bu radikaller esansiyel protein ve nükleik asitleri oksitlemekte ve doku kanlanması azaltan hasarlar ortaya çıkarmaktadır. Buna ek olarak CO maruziyetinin lipid peroksidasyonuna yol açtığı gösterilmiştir, örneğin doymamış yağ asitlerinin

degradasyonu SSS lipidlerinin geri dönüşlü demiyelinizasyonuna sebep olduğu kanıtlanmıştır. CO maruziyeti bununla beraber hücreler üzerinde ksantin dehidrogenazın, ksantin oksidaza dönüşmesi ile O₂ radikallerinin oluşması hücreler için substansiyal oksidatif stres yaratmaktadır [21].

Respiratuvar pigmentler, enzimler ve proteinler (miyoglobin, Hb, sitokrom aa3 ve sitokrom P450) ile birleşen CO'in , çözülmüş halde direkt, elektron transport zincirinde terminal enzim olarak bilinen sitokrom-a3 gibi, sitokrom oksidaz enzimleriyle bağlanması sonucu etki gösterdiği düşünülmektedir. Hipoksi ve kan akımında görülen azalma, karbonmonoksidin sitokrom c oksidaza bağlanıp inhibe etmesine ve mitokondriyal düzeyde hücre solunumu bozmasına yol açmaktadır [3,22]. Bunların neticesinde aerobik olarak ATP üretilmesi bozulmakta ve tedbir alınmadıkça hücrelerin anaerob solunuma başlamasıyla hücrelerde laktik asidoz ve ölüm görülmektedir. Metilen mavisi, sitokrom c redüktaz elektronunu alarak kompleks I ve kompleks III'ün (sitokrom c redüktaz) proton pompalamasına izin vermesi ile ATP sentezinin devamı sağlanmaktadır. CO sitokrom P450 hemoproteinine bağlanabilir. Bu ilişki sayesinde CYP 450 enzimlerinin spektroskopik özellikleri çalışılmalarda kullanılmıştır [3].

Mitokondriyal düzeyde yapılan solunum zinciri içerisinde hem grubu içermeleri nedeniyle kompleks-III (suksinat-koenzim Q redüktaz) ve kompleks-IV (sitokrom c oksidaz)'te bulunan sitokromlar CO'e affinite göstermektedir. Sitokrom c oksidaz aktivitesi COHb seviyelerinden normale daha uzun sürede dönebilmektedir ve bu sebeple geç nöronal hasarda sitokrom c oksidazın rol oynadığı düşünülmektedir. Karbonmonoksit aynı zamanda iskelet kası ve kardiyak miyoglobine bağlanmaktadır. Karboksimiyoglobin (COMb) ayrılması COHb'e göre daha uzun sürede gerçekleştiğinden CO'in miyoglobinden ayrılması ve Hb'e bağlanması nedeni ile COHb yükselmesinin gecikmiş bir şekilde gözlenebileceği unutulmamalıdır [3].

Klinik

CO zehirlenmesi kalp, böbrek, beyin, iskelet kası, periferik sinir ve deri gibi nerdeyse bütün organları etkilemektedir [22,23]. CO zehirlenmesinde ortaya çıkan semptom ve bulgular erken dönemde görülebileceği gibi haftalar sonra da gözlenebilmektedir. Beyin ve kalp, O₂ tüketimi yüksek olan organlar olmasından dolayı başlıca semptomlar nöropsikiyatrik ve kardiyovasküler semptomlardır [23].

Akut dönemde belirtiler halsizlik, dispnesi, letarji, çarpıntı, göğüs ağrısı, üst solunum yolu enfeksiyon semptomları, konfüzyon, halüsinasyon, depresyon, ajitasyon, diare, kusma, karın ağrısı, baş ağrısı, konfüzyon, baş dönmesi, görme bozukluğu, hafıza ve yürüyüş bozukluğu, nöbet, senkop, üriner inkontinans, nörolojik semptomlar ve koma şeklinde görülebilmektedir [24]. Kronik zehirlenmelerde ise akut semptomlara ilaveten ilerleyen nöropsikiyatrik semptomlar ve kognitif fonksiyon bozukluğu gelişebilmektedir [22].

CO zehirlenmelerinde başlangıçta baş ağrısı, halsizlik, baş dönmesi, kusma, bulantı gibi nonspesifik bulgular nedeniyle gastroenterit, besin zehirlenmesi, gribal enfeksiyon gibi tanılar ile

karıştırılabilmektedir [24,25]. CO zehirlenmelerinde mortalite nedeni çoğunlukla nörolojik sekeller ve ventriküler disritmiler olarak belirtilmektedir. Ölüm nedeni olarak çoğunlukla ventriküler disritmiye bağlı kardiyak arrest olduğu belirtilmektedir [28]. Nörolojik ve psikiyatrik bulgulardan en çok konfabulasyon ile beraber olan anterograd ve retrograd amneziyi içeren bozukluklar görülebilmektedir. Hastalarda yargı bozukluğu, duygu değişikliği ve kognitif fonksiyonlarda azalma görülebilmektedir. Diğer bulgular hastalarda uyusma, duyarsızlık, koma, rijidite, yürüme ve hareket bozuklukları olarak gözlenebilmektedir. Hasta reflekslerinde sertleşme, apraksi, agnozi, tik bozuklukları, psikoz, körlük ve işitme vestibuler disfonksiyon görülebilmektedir. Uzun süren ve şiddetli maruziyetler sonrasında sıklıkla nöropsikiyatrik sekeller gelişmektedir. Ek olarak, bazı hastalarda gecikmiş nöropsikiyatrik belirtiler görülebilmektedir. Koma çoğunlukla şiddetli maruziyetle ilişkilendirilmektedir [26]. CO zehirlenmesinde tanıyı COHb düzeylerinin yüksekliği desteklese de COHb düzeyleri ile klinik bulgular ve prognoz arasında ilişki kurmak sağlıklı sonuçlar vermemektedir [24, 27, 28]. Maruziyet süresi çok önemlidir. Karbonmonoksit zehirlenmelerinde kronik maruziyetlerde düşük COHb düzeyleri izlense bile akut CO zehirlenmelerinde görülen yüksek COHb düzeylerine sahip tablodan daha ağır seyredebilmektedir [27].

Tablo 1. Kandaki COHb düzeyine göre klinik bulgular

Kandaki COHb düzeyi	Semptom ve bulgular
% 0- 10	Semptom yok
% 10-20	Hafif baş ağrısı, cilt yüzeyinde damarlarda genişleme, bulantı, yorgunluk, taşipne, duygusal dengesizlik, konfüzyon, sakarlık
% 21-30	Şakakta zonklayıcı ağrı, efor dispnesi, anjina, görme duyusunda değişiklikler, tehlike anında tepki vermede zayıflık, güç kaybı, duylarda zayıflama
% 31-40	Şiddetli baş ağrısı, bulanık görme, kollaps, güçsüzlük, baş dönmesi, bulantı, vişne kırmızı renk cilt ve dudaklar, sersemlik, kusma, karar almada yetersizlik
% 41-50	Bayılma, bilinç değişiklikleri, unutkanlık, taşikardi, taşipne
% 51-60	Nöbetler, koma, belirgin asidoz, ölümlerle sonuçlanabilir.
> % 60	Ölüm

Tanı

Tanıda hastalığın hikayesi en önemli etmendir. Hastaların %30'unda semptomlar spesifik olmadığı için gözden kaçabilmektedir [9]. Gastroenterit, infantil kolik veya gribal enfeksiyon ile sıklıkla karışabilmekte ve baş ağrısı, takipne, taşikardi, letarji, kusma, bulantı gibi semptomlarla gribal enfeksiyonu düşündürebilmektedir [4, 30]. Mevsimsel olarak soba kullanımı ve gribal enfeksiyonların yaygın olması ile daha çok kış aylarında bu şikayetlerle başvuran hastalar detaylı sorgulanmalı ve tanı koymada geç kalmanın sonucunda ölüm olabileceği unutulmamalıdır. Bazen çocuklarda kronik

zehirlenmelerde görme bozukluğu, okul başarısında gerilik, karın ağrısı, göğüs ağrısı gibi spesifik olmayan semptomlar görülebilmektedir. CO zehirlenmesi, ayırıcı tanıda göz ardı edilmemelidir [4,31].

Hastalarda solunum sistemi etkilenmemiş ise nabız oksimetre ile ölçülmekte olan O₂ saturasyonu genellikle normal aralıkta bulunmaktadır. Bu nedenle kesin tanı nabız oksimetre ile konulamamaktadır. Venöz ve arteriyel kanda COHb düzeyinin %3'ün üstünde olması tanıda yararlıdır ancak sigara içen hastalarda %10 düzeyine çıkabilmektedir. Hasta acil servise geç getirilmiş veya acil servise gelmeden az da olsa oksijen tedavisi almış ise COHb düzeyinin yüksekliği görülmeyebilir. Sonuç olarak COHb yüksekliği önemli iken düşük olması tanıyı eleyemez ve tedaviye ihtiyaç duyulmayacağını da göstermez. Çünkü rabdomiyoliz, çoklu organ yetmezliği, nonkardiyojenik pulmoner ödem, dissemine akut tübüler nekroz, intravasküler koagülasyon defekti, inkontinans, gecikmiş nöropsikiyatrik komplikasyonlar kronik dönemde ortaya çıkabilmektedirler. Klinik şüphe hayati önem taşımaktadır [30]. Ayrıca COHb seviyesi hastalığın tedavisinde belirteç olarak kullanılabilir. Hastalarda metabolik asidoz ve serum laktat artışı varsa uzun süreli maruziyet akla getirilmelidir [29,30]. Organ yetmezliği ve doku hipoksisi açısından karaciğer fonksiyon testleri, hemogram, kas enzimleri, böbrek fonksiyon testleri, kardiyak enzimleri ve idrar tetkiki istenmesi oldukça önemlidir. Klinik şüphe durumlarında akciğer grafisi ve beyin görüntüleme yöntemlerine başvurulmalıdır. Zehirlenme için cilt ve mukozal katmanların kiraz kırmızısı rengi tanı koymak için yeterli olmakla beraber ancak ölüm sonrası ortaya çıktığı için tanısal değeri bulunmamaktadır [32].

Postmortem Değişiklikler

Karbonmonoksitin Hb ile birleşerek dokulara oksijen taşınmasına engel olarak bir tür anemik tipte bir asfiksiye (anemik hipoksi) yol açtığı kabul edilmektedir. Kaslardaki miyoglobine olan afinitesi oksijenden 17 kez fazla olup, miyoglobinin ile birleşir [33].

Cildin kiraz kırmızısı renklenmesinin vücut yüzeyinin en karakteristik görünümü CO zehirlenmeleridir. Ölü lekelerinin parlak kırmızı renk alması tanı için çok yararlı bir bulgudur. Koyu tenli kurbanlarda, konjonktivalarda, tırnak yataklarında ve dudak mukozasında renk değişikliği belirgindir. Aynı şekilde tırnak altları ve dudaklar da yüksek CO saturasyonlarında açık pembe renk alır. Ancak bu renk anemik olgularda ve yaşlılarda hemoglobin miktarının azalması nedeniyle belirgin olmayabilmektedir ve aynı renk değişikliği, soğuğa maruz kalma, donma ve siyanür zehirlenmesinde de görülebileceğinden dikkatli olunması gerekmektedir. Bu CO zehirlenmesine bağlı renk değişikliği genellikle %30'u aşan COHb konsantrasyonlarında görülür.

Otopsi sonucunda, COHb ve COMb oluşumuyla kiraz kırmızısı rengine sahip kan, organ ve kaslar dikkat çekmektedir. Ayrıca akciğer ödemi ve genelleşmiş organ tıkanıklığı da gözlenmektedir. İç muayenede bütün iç organlar, mukozalar ve seröz yapılar, damar iç yüzeyleri açık pembe renkli görünümündedir. Kan akıcı özellikte olup bir sulandırıldığında karmen rengine dönmektedir. Kanın rengi açık ortamda bir yüzeye yayılıp bekletildiğinde açılır. Akciğerler şiş, ödemli, açık kırmızı renkte olup,

çok sayıda subplevral kanama odakları içermektedir ve kesitlerinden bol miktarda köpüklü, kanlı ödem sıvısı geldiği gözlenmiştir. Bu sıvı hava ile temasta belirgin olarak karmen kırmızısı rengi (ödem karmine) almaktadır. Peteşiler, plevra dışında; perikard, saçlı deri altı, meninksler, beyin dokusu içinde de görülmüştür [33, 34, 35].

Globus pallidum nekrozu, uzun süre meydana gelen CO zehirlenmelerinde gözlenmektedir. Altta yatan mekanizmaların hipoksik beyin hasarının yanı sıra apoptozu da içerdiğini düşündürmektedir düşünülmektedir [35, 37, 38].

CO zehirlenmesinin semptomları ve otopsi bulguları nonspesifik olarak ortaya çıkmaktadır. Bu sebeple teşhis kanda COHb düzeyinin saptanması ile konulmalıdır [37]. Bazı kaynaklardada ölümle sonlandığı bildirilen en düşük COHb seviyesinin %33.6 gözlendiği ve ölümün sıklıkla %40-49 COHb seviyesinde bulunduğunu belirtilmiştir. Düşük COHb seviyesinde görülen ölümlere kalp ve akciğer hastalıklarının eşlik ettiğini bildirilmiştir [39, 40]. Ayrıca COHb düzeyinin %20 seviyesini aştığı anda görülen ani ölümlerde ciddi ateroskleroza neden olabildiği bildirilmektedir [39].

Yapılan literatür taraması sonucu Cantürk ve arkadaşlarının çalışmasında COHb seviyesi %30'un altında ve CO zehirlenmesi nedeniyle ölümün meydana geldiği düşünülen iki olgu bulunmaktadır. Bu iki olguda ölüme sebep gösterilebilecek herhangi bir patolojik ve ya travmatik neden saptanmamış olup iki olguda da akciğerde çok spesifik olmayan ödem harici bir bulgu tespit edilememiştir. Akciğer ya da kalp hastalığı olanlarda ve yaşlılarda %25 gibi düzeylerde ölümün gerçekleşebileceği ve CO'e olan duyarlılıklarının bireylerde değişken olabileceği bildirilmektedir [41].

Otomobil egzoz gazı inhalasyonu durumunda, nitrojen oksidin solunması methemoglobin (MetHb) üretimine yol açmaktadır ve bunun COHb'ye ek olarak dikkate alınması gerekmektedir. Bazı vakalarda yüksek MetHb konsantrasyonları rapor edilmiştir, ancak methemoglobinemi yaygın görülmemektedir [42-44]. Saldırı vakalarında, yanma sırasında oksijen tüketiminden kaynaklanan diğer toksik gazların varlığı (siyanür ve fosgen gibi) ve oksijen eksikliği gibi ilave değerlendirmeler yapılmaktadır. Siyanür MetHb'ye bağlanarak detoksifiye edildiğinden, toksisiteyi değerlendirirken kurbanın kanındaki MetHb konsantrasyonuna dikkat edilmelidir ve yangın kurbanlarından şüphelenildiğinde COHb, siyanür ve MetHb ölçülmelidir [45].

Tüm kurbanların ciddi yaralanmalar olmaksızın yangına karıştığı vakada duman ve ısının etkisini tartışmak için çalışmalar yapılmıştır. Açık hava ateşinde hayatını kaybedenlerin kalp kanındaki postmortem COHb seviyeleri %30'un altında iken, ev yangını sonucu hayatını kaybedenlerde COHb seviyeleri değişkenlik göstermektedir. Yangın ortamındaki kişinin alevler ulaştığında canlı olup olmadığını değerlendirirken %10'un üzerindeki COHb seviyesi kişinin canlı olduğunu yani nefes aldığını gösteren önemli bir bulgu olarak kabul edilir. Yangın kurbanlarında CO tayini için en iyi örnek, yangın yerinde atmosferik CO ile daha az kontamine olan iç damarlardan ve kalpten alınan kandır [46].

Ancak ciddi kan kaybı olduğunda dalak kanı ve dalak sıkışması alternatif örnekler olarak kullanılabilir [47].

Postmortem aralığı uzun olan bir vakadan alınan bir numunede çürümeye bağlı ölüm sonrası CO oluşumu bildirilmiştir. Bu, hemoglobin ve miyoglobin gibi hem-proteinlerinin bozunmasına bağlanmıştır. Postmortem CO oluşumu da koşulsuz ve uzun süre suya daldırma gibi örnekler bildirilmiştir. CO inhalasyonu olmaksızın boğulma vakalarında bazen plevral efüzyonda %10'un üzerindeki COHb değerleri gözlenmektedir. Postmortem CO oluşumu için indikatör tanımlanmadığından, şiddetli çürüme içeren durumlarda CO ölçümü için vücut boşluğu sıvılarını kullanılmaması önerilmektedir [46-51].

Postmortem dönemde çevre havasındaki CO, kana ulaşmamaktadır. Bir araştırmada ceset 42 saat CO'e maruz bırakılmış ve kan CO seviyesinde bir değişiklik bulunmamıştır. Yangına bağlı ölümlerin postmortem incelemelerinde kalbin sağ ve sol ventriküllerinde COHb seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bunun sebebi muhtemelen COHb'nin yavaş yıkılması ve böylece tüm dolaşımda eşit konsantrasyonların bulunmasıdır. Ayrıca CO'e maruz kalmış ve COHb'nin yıkılması için yeterli süre yaşamış kişilerde COHb oranı %10'un altında bulunabilir. Ölüm sebebi yine de CO zehirlenmesidir [52, 53].

CO'ya maruz kalma derecesi en çok COHb ölçüleriyle, en sık klinik spektrofotometrik yöntemlerle değerlendirilir [54, 55]. 1960'lardan beri gaz kromatografi (GC) yönteminin kullanımı adli toksikoloji laboratuvarlarında daha yaygın hale gelmiştir [55-60]. Bununla birlikte, uygun, otomatikleştirilmiş yöntemler, örnek kalitesini iyileştirmek için ditiyonit azaltma, homojenleştirme ve deterjan işlemi gibi bazı ön işlemler kullanılmış olsa da, oldukça sağlam kan analizi ile sınırlıdır [54, 56]. Ayrıca, yaşlanmış, pıhtılaşmış kısmen bozulmuş ve/veya ısıya maruz kalmış ölüm sonrası kanın analizi genellikle bu yöntemlerin kapasitesinin dışındadır. Bununla birlikte, genellikle kan, canlı deneklerden elde edilebilen tek örnektir. Bunun tersine, ölen deneklerde, CO maruziyetinin ölüm nedenine katkıda bulunup bulunmadığını öğrenmek için analiz için kan veya diğer dokular toplanabilir. Bazı durumlarda sadece katı organlar bulunabilir ve kan yerine analiz yapılabilmektedir [60].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Cildin kiraz kırmızısı renklenmesinin vücut yüzeyinin en karakteristik görünümü CO zehirlenmeleridir. Bu genellikle %30'u aşan COHb konsantrasyonlarında görülmüştür. Otopsi, COHb ve karboksimiyoglobin oluşumuyla benzer kiraz kırmızısı rengine sahip kan, organ ve kasları ortaya çıkarmaktadır. Akciğer ödemi ve genelleşmiş organ tıkanıklığı da gözlenmektedir.

CO zehirlenmesinin semptom ve otopsi bulgularının spesifik olmadığı çalışmalarda belirtilmiştir. Bu nedenle kanda COHb saptanması ile teşhis konulması önemlidir. CO maruziyetine bağlı ölümler geniş bir %COHb aralığında kaydedilmiş olsa da, CO zehirlenmesinin ölüm nedeni olarak belirtilen

çoğu ölüm, %50'den fazla %COHb ile ilişkili bulunmuştur. CO maruziyeti, %COHb'nin %10-50 olduğu ölümlerde katkıda bulunan bir faktör olabileceği görülmüştür.

Kandaki CO analizi, en yaygın olarak, IL CO-Oksimetre gibi bir klinik analizör veya ultraviyole görünür spektrofotometre kullanılarak bir spektrofotometrik teknik kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Spektrofotometrik yöntemler CO'yu COHb olarak ölçer ve bu nedenle Hb'ye bağlıdır.

Ayrıca, yaşlanmış, pıhtılaşmış kısmen bozulmuş ve / veya ısıya maruz kalmış ölüm sonrası kanın analizi genellikle bu yöntemlerin kapasitesinin dışında kalmıştır. Bununla birlikte, genellikle kan, canlı deneklerden elde edilebilen tek örnektir. Bunun tersine, ölen deneklerde, CO maruziyetinin ölüm nedenine katkıda bulunup bulunmadığını öğrenmek için analiz için kan veya diğer dokular toplanabilmektedir. Bazı durumlarda sadece katı organlar bulunabilir ve kan yerine analiz yapılabilmektedir.

Bu çalışmada incelediğimiz kaynaklara göre, kan, kas, beyin, akciğer ve böbrek gibi dokuların, ölümcül CO'ya maruz kalma nedeniyle ölüm teşhisi için en uygun dokular olduğu ve bunun için kullanılabileceği görülmüştür.

CO zehirlenmeleri önlenemez kazalardandır. Karbonmonoksit üretebilecek ısıtma ve ısınma sistemlerinin düzenli bakımı ve kontrolü sağlanarak; kullanılan yakıtların, bacaların, havalandırma sisteminin standartlara uygun olması ve toplumun bu konudaki farkındalığı sağlanarak bu halk sağlığı sorunun önüne geçilmesi düşünülmektedir.

Eve kurulan alarmlı CO monitörleri nispeten ucuz ve potansiyel olarak hayat kurtarıcıdır. CO duvarlardan, ahşaplardan kolayca difüze olabildiği için tüm evlerin bir CO monitörüne sahip olması önerilmektedir. Binaların menfez, baca ve tesisatlarının usulüne uygun yapılması ve sürekli denetimi çok önemlidir. Baca ve tesisat ustalığı yapanların ustalık, çıraklık eğitimi ve sertifikasyonu sağlanmalıdır. İmkanlar dahilinde sobalı evler yerine kaloriferli evlere geçilmelidir.

Mevsimsel olarak soba kullanımı ve gribal enfeksiyonların yaygın olması ile daha çok kış aylarında bu şikayetlerle başvuran hastalar detaylı sorgulanmalı ve tanı koymada geç kalmanın sonucunda ölüm olabileceği unutulmamalıdır.

YAZAR KATKILARI

Kavram: A.K, B.C.E.; Tasarım: A.K, B.C.E.; Denetim: A.K, B.C.E.; Kaynaklar: A.K, B.C.E.; Malzemeler:- Veri Toplama ve/veya İşleme: A.K, B.C.E.; Analiz ve/veya Yorumlama: A.K, B.C.E.; Literatür Taraması A.K, B.C.E.; Makalenin Yazılması: A.K, B.C.E.; Kritik İnceleme: A.K, B.C.E.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Abelsohn, A., Sanborn, M. D., Jessiman, B. J., Weir, E. (2002). Identifying and managing adverse environmental health effects: 6. Carbon monoxide poisoning. *Canadian Medical Association Journal*, 166(13), 1685-1690. [\[CrossRef\]](#)
2. Alonso, J. R., Cardellach, F., López, S., Casademont, J., Miró, Ò. (2003). Carbon monoxide specifically inhibits cytochrome c oxidase of human mitochondrial respiratory chain. *Pharmacology & Toxicology*, 93(3), 142-146. [\[CrossRef\]](#)
3. Choi, I.S. (2001). Carbon monoxide poisoning: systemic manifestations and complications. *Journal of Korean Medical Science*, 16, 253-61. [\[CrossRef\]](#)
4. Ernst, A., Zibrak, J. D. (1998). Carbon monoxide poisoning. *New England Journal of Medicine*, 339(22), 1603-1608. [\[CrossRef\]](#)
5. Akkose, S., Turkmen, N., Bulut, M., Akgoz, S., Iscimen, R., Eren, B. (2010). An analysis of carbon monoxide poisoning cases in Bursa, Turkey. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 16(1), 101-106. [\[CrossRef\]](#)
6. Silvers, S. M., Hampson, N. B. (1995). Carbon monoxide poisoning among recreational boaters. *Journal of the American Medical Association*, 274(20), 1614-1616. [\[CrossRef\]](#)
7. Cobb, N., Etzel, R. A. (1991). Unintentional carbon monoxide-related deaths in the United States, 1979 through 1988. *Journal of the American Medical Association*, 266(5), 659-663. [\[CrossRef\]](#)
8. Sever, H., İkizceli, Ş., Avşaroğulları, L., Sözüer, E. M., Özkan, S., Yürümez, Y., Yavuz, Y. (2005). Nonspesifik semptomlarla acil servise başvuran hastalarda karbonmonoksit zehirlenmesi. *Türkiye Acil Tıp Dergisi*, 5(1), 18-21. [\[CrossRef\]](#)
9. Kandis, H., Katırcı, Y., Çakır, Z., Aslan, Ş., Uzkeser, M., Bilir, Ö. (2007). Acil servise karbonmonoksit entoksikasyonu ile başvuran olguların geriye dönük analizi. *Akademik Acil Tıp Dergisi*, 5(3), 21-5. [\[CrossRef\]](#)
10. Gill, A. L., Bell, C. N. (2004). Hyperbaric oxygen: Its uses, mechanisms of action and outcomes. *An International Journal of Medicine*, 97(7), 385-395. [\[CrossRef\]](#)
11. World Health Organization. (1999). Environmental health criteria 213: Carbon monoxide. [\[CrossRef\]](#)
12. Farraj, A. K., Hazari, M. S., Costa, D. L. (2015). Pulmonary toxicology. *Mammalian Toxicology*, 519-538. [\[CrossRef\]](#)

13. Tobias, C. A., Lawrence, J. H., Roughton, F. J. W., Root, W. S., Gregersen, M. I. (1945). The elimination of carbon monoxide from the human body with reference to the possible conversion of CO to CO₂. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 145(2), 253-263. [\[CrossRef\]](#)
14. Handa, P. K., Tai, D. Y. H. (2005). Carbon monoxide poisoning: A five-year review at Tan Tock Seng hospital, Singapore. *Annals-Academy of Medicine Aingapore*, 34(10), 611. [\[CrossRef\]](#)
15. Henry, C. R., Satran, D., Lindgren, B., Adkinson, C., Nicholson, C. I., Henry, T. D. (2006). Myocardial injury and long-term mortality following moderate to severe carbon monoxide poisoning. *Journal of the American Medical Association*, 295(4), 398-402. [\[CrossRef\]](#)
16. Jain, K. K. (2004). Hypoxia,[w:] Textbook on hyperbaric medicine, 4th revised and expanded edition. [\[CrossRef\]](#)
17. Omaye, S. T. (2002). Metabolic modulation of carbon monoxide toxicity. *Toxicology*, 180(2), 139-150. [\[CrossRef\]](#)
18. Huzar, T. F., George, T., Cross, J. M. (2013). Carbon monoxide and cyanide toxicity: Etiology, pathophysiology and treatment in inhalation injury. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 7(2), 159-170. [\[CrossRef\]](#)
19. Tursun, S., Alpcan, A., Şanlı, C., Kabalcı, M. (2017). Karbonmonoksit zehirlenmesi. *Ortadoğu Tıp Dergisi*, 9(4), 203-206. [\[CrossRef\]](#)
20. Prockop, L. D., Chichkova, R. I. (2007). Carbon monoxide intoxication: An updated review. *Journal of the Neurological Sciences*, 262(1-2), 122-130. [\[CrossRef\]](#)
21. Prockop, L. D. (2005). Carbon monoxide brain toxicity: Clinical, magnetic resonance imaging, magnetic resonance spectroscopy, and neuropsychological effects in 9 people. *Journal of Neuroimaging*, 15(2), 144-149. [\[CrossRef\]](#)
22. Choi, S. A., Choi, I. S. (1998). Clinical manifestations and complications in carbon monoxide intoxication. *Journal of the Korean Neurological Association*, 16(4), 500-505. [\[CrossRef\]](#)
23. Tintinalli, J. E., Kelen, G. D., Stapczynski, S. J., Tintinalli, J. E., Kelen, G. D., Stapczynski, J. S. (2000). Carbon monoxide poisoning. *Emergency Medicine: A Comprehensive Study Guide. 5th ed. North Carolina: McGraw-Hill*, 1302-1306. [\[CrossRef\]](#)
24. Deniz, T., Kandiş, H., Saygun, M., Büyükkoçak, Ü., Ülger, H., Karakuş, A. (2009). Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi acil servisine başvuran zehirlenme olgularının analizi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 11(2), 15-20. [\[CrossRef\]](#)
25. Weaver, L.K., Hopkins, R.O., Chan, K.J., Churchill, S., Elliott, C.G., Clemmer, T.P., Orme, J.F. Jr., Thomas, F.O., Morris, A.H. (2002). Hyperbaric oxygen for acute carbon monoxide poisoning. *New England Journal of Medicine*, 347(14), 1057-1067. [\[CrossRef\]](#)
26. Weaver, L. K., Valentine, K. J., Hopkins, R. O. (2007). Carbon monoxide poisoning: Risk factors for cognitive sequelae and the role of hyperbaric oxygen. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 176(5), 491-497. [\[CrossRef\]](#)
27. Rodaplı, Ü. (2000). Karbonmonoksit zehirlenmesi. *Acil Tıp Dergisi (özel sayı)*:130-4. [\[CrossRef\]](#)

28. Kandış, H., Katırcı, Y., Karapolat, B. S. (2009). Karbonmonoksit zehirlenmesi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 11(3), 54-60. [\[CrossRef\]](#)
29. Gozubuyuk, A. A., Dag, H., Kaçar, A., Karakurt, Y., Arica, V. (2017). Epidemiology, pathophysiology, clinical evaluation, and treatment of carbon monoxide poisoning in child, infant, and fetus. *Northern Clinics of Istanbul*, 4(1), 100. [\[CrossRef\]](#)
30. Tursun, S., Alpcan, A., Şanlı, C., Kabalcı, M. (2017). Karbonmonoksit zehirlenmesi. *Ortadoğu Tıp Dergisi*, 9(4), 203-206. [\[CrossRef\]](#)
31. Gorman, D. F., Clayton, D., Gilligan, J. E., Webb, R. K. (1992). A longitudinal study of 100 consecutive admissions for carbon monoxide poisoning to the Royal Adelaide Hospital. *Anaesthesia and Intensive Care*, 20(3), 311-316. [\[CrossRef\]](#)
32. Buckley, N. A., Isbister, G. K., Stokes, B., Juurlink, D. N. (2005). Hyperbaric oxygen for carbon monoxide poisoning. *Toxicological Reviews*, 24(2), 75-92. [\[CrossRef\]](#)
33. Demirci, Ş., Doğan, K.H. (2010). Asfiksi türleri ve asfiksi olgularında ölü muayenesi. *Birinci Basamakta Adli Tıp. Koc S, Can M. Eds, İstanbul*, 38-56. [\[CrossRef\]](#)
34. Saukko, P., Knight, B. (2015). *Knight's forensic pathology*. CRC press. [\[CrossRef\]](#)
35. Koç, S., Özasan A. (1999). "Adli Otopsi ve Adli Patoloji," *Birinci Basamak İçin Adli Tıp El Kitabı*, Ankara: Türk Tabipleri Birliği Yayını, 36-82. [\[CrossRef\]](#)
36. Okada, M., Okuda, B., Okae, S. (1982). Bilateral necrosis of the pallidum in a case of carbon monoxide poisoning. *Neurological Medicine*, 17, 304-305. [\[CrossRef\]](#)
37. Kinoshita, H., Türkan, H., Vucinic, S., Naqvi, S., Bedair, R., Rezaee, R., Tsatsakis, A. (2020). Carbon monoxide poisoning. *Toxicology Reports*, 7, 169-173. [\[CrossRef\]](#)
38. Uemura, K., Harada, K., Sadamitsu, D., Tsuruta, R., Takahashi, M., Aki, T., Yasuhara, M., Maekawa, T., Yoshida, K. (2001). Apoptotic and necrotic brain lesions in a fatal case of carbon monoxide poisoning. *Forensic Science International*, 116(2-3), 213-219. [\[CrossRef\]](#)
39. Cantürk, N., Başbulut, A. Z., Cantürk, G., Dağalp, R. (2008). Ankara'da 2002-2006 yılları arasında karbonmonoksit zehirlenmeleri otopsi olgularının değerlendirilmesi. *Adli Tıp Dergisi*, 22(1), 25-30. [\[CrossRef\]](#)
40. Berber, G., Üzün, Ş., Ak, N. (2002). 1995-1998 Yılları arasında ATK Morg Gıhtisas Dairesine gelen karbonmonoksit zehirlenmelerinin değerlendirilmesi. *Yıllık Adli Tıp Toplantıları Kitabı*, 16-19. [\[CrossRef\]](#)
41. Tıp, K. B. S. A. (1995). Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı. *Editör Birgen N. İstanbul*, 343. [\[CrossRef\]](#)
42. Suyama, H., Morikawa, S., Noma-Tanaka, S., Adachi, H., Kawano, Y., Kaneko, K., Ishihara, S. (2005). Methemoglobinemia induced by automobile exhaust fumes. *Journal of Anesthesia*, 19(4), 333-335. [\[CrossRef\]](#)
43. Vevelstad, M., Morild, I. (2009). Lethal methemoglobinemia and automobile exhaust inhalation. *Forensic Science International*, 187(1-3), e1-e5. [\[CrossRef\]](#)

44. Kuo, Y. M., Nussbaum, R. L. (2015). Prolongation of chemically-induced methemoglobinemia in mice lacking α -synuclein: a novel pharmacologic and toxicologic phenotype. *Toxicology Reports*, 2, 504-511. [[CrossRef](#)]
45. Moriya, F. (2015). Poisoning due to carbon monoxide and cyanide gas generated in the occurrence of fire. *Chudoku kenkyu: Chudoku Kenkyukai jun kikanshi= The Japanese journal of toxicology*, 28(4), 339. [[CrossRef](#)]
46. Dogan, K. H., Demirci, S., Erkol, Z., Gulmen, M. K. (2010). Accidental hanging deaths in children in Konya, Turkey between 1998 and 2007. *Journal of Forensic Sciences*, 55(3), 637-641. [[CrossRef](#)]
47. Breitmeier, D., Mansouri, F., Albrecht, K., Böhm, U., Tröger, H. D., Kleemann, W. J. (2003). Accidental autoerotic deaths between 1978 and 1997: Institute of legal medicine, medical school hannover. *Forensic Science International*, 137(1), 41-44. [[CrossRef](#)]
48. Kojima, T., Yashiki, M., Une, I., Nishiyama, Y. (1980). Post-mortem formation of carbon monoxide in a drowned body. *Nihon Hoigaku Zasshi*, 34, 163-168. [[CrossRef](#)]
49. Kojima, T., Nishiyama, Y., Yashiki, M., Une, I. (1982). Postmortem formation of carbon monoxide. *Forensic Science International*, 19(3), 243-248. [[CrossRef](#)]
50. Kojima, T., Yashiki, M., Okamoto, I., Noda, J., Une, I., Miyazaki, T., Chikasue, F. (1984). Postmortem formation of carbon monoxide in blood and body cavity fluids of rats drowned and kept immersed in fresh water. *Hiroshima Journal of Medical Sciences*, 33(4), 591-594. [[CrossRef](#)]
51. Kojima, T., Okamoto, I., Yashiki, M., Miyazaki, T., Chikasue, F., Degawa, K., Oshida, S., Sagisaka, K. (1986). Production of carbon monoxide in cadavers. *Forensic Science International*, 32(2), 67-77. [[CrossRef](#)]
52. Kinoshita, H., Türkan, H., Vucinic, S., Naqvi, S., Bedair, R., Rezaee, R., Tsatsakis, A. (2020). Carbon monoxide poisoning. *Toxicology Reports*, 7, 169-173. [[CrossRef](#)]
53. Maxeiner, H. (2001). Congestion bleedings of the face and cardiopulmonary resuscitation—an attempt to evaluate their relationship. *Forensic Science International*, 117(3), 191-198. [[CrossRef](#)]
54. Widdop, B. (2002). Analysis of carbon monoxide. *Annals of Clinical Biochemistry*, 39(4), 378-391. [[CrossRef](#)]
55. Mahoney, J. J., Vreman, H. J., Stevenson, D. K., Van Kessel, A. L. (1993). Measurement of carboxyhemoglobin and total hemoglobin by five specialized spectrophotometers (CO-oximeters) in comparison with reference methods. *Clinical Chemistry*, 39(8), 1693-1700. [[CrossRef](#)]
56. Collison, H. A., Rodkey, F. L., O'Neal, J. D. (1968). Determination of carbon monoxide in blood by gas chromatography. *Clinical Chemistry*, 14(2), 162-171. [[CrossRef](#)]
57. Costantino, A. G., Park, J., Caplan, Y. H. (1986). Carbon monoxide analysis: A comparison of two CO-oximeters and headspace gas chromatography. *Journal of Analytical Toxicology*, 10(5), 190-193. [[CrossRef](#)]

58. Vreman, H. J., Kwong, L. K., Stevenson, D. K. (1984). Carbon monoxide in blood: An improved microliter blood-sample collection system, with rapid analysis by gas chromatography. *Clinical Chemistry*, 30(8), 1382-1386. [[CrossRef](#)]
59. Vreman, H. J., Stevenson, D. K., Zwart, A. (1987). Analysis for carboxyhemoglobin by gas chromatography and multicomponent spectrophotometry compared. *Clinical Chemistry*, 33(5), 694-697. [[CrossRef](#)]
60. Vreman, H. J., Wong, R. J., Stevenson, D. K., Smialek, J. E., Fowler, D. R., Li, L., Vigorito, R.D., Zielke, H. R. (2006). Concentration of carbon monoxide (CO) in postmortem human tissues: Effect of environmental CO exposure. *Journal of Forensic Sciences*, 51(5), 1182-1190. [[CrossRef](#)]

Yayın 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 hiç bir yerde yayınlanmamış, Türkçe veya yabancı dilde (İngilizce, Fransızca, İspanyolca ve Almanca) 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 yayımlanır.
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 yayımlandıktan önce yazarların yayımcıya makalenin “Copyright Transfer Form”unu doldurarak telif hakkını göndermesi gerekmektedir.
6. Yayınlarda 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) **Ön bilgiler:** Devam etmekte olan bir çalışmanın bulgularını zaman kaybetmeden duyurmak için Türkçe veya İngilizce yazılan en çok 5 A4 kağıdı sayfası olan makalelerdir.

Yazım Kuralları

1. Metinler, A4 normunda (21 x 29,7 cm) yazılmış olmalıdır.
2. Metinler A4 normundaki sayfanın sağ ve sol tarafından 2,5 cm., üst ve alt kenarlarından 3 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.
3. Sayfa numaraları makalede **belirtilmemelidir**.
4. Paragraf başları **1 cm içeriden** başlamalıdır. Paragraflar arası ilave boşluk bırakılmamalıdır.
5. Başlık sayfasında yayın adı, yazar/yazarların adları ve yazışma yapılacak yazarın açık adresi, telefon ve faks numaraları, varsa e-mail adresi belirtilmeli ve ortalı yazılmalıdır. Sorumlu yazarın soyadının üstüne (*) işareti konularak belirtilmelidir. Bu kişinin Adı Soyadı, açık adresi, faks numarası, telefon numarası ve e-mail adresi başlık sayfasının en altında belirtilmelidir.
6. **Yazar Adı** (ilk harfi büyük diğerleri **küçük harf**) ve **SOYADI** (tamamı **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 (Örneğin: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06100, Ankara, Türkiye) açıkça yazılmalıdır.
 - **Tüm yazarlar için ORCID numarası** mutlaka beyan edilmelidir. Yazarların ORCID ID’leri ilgili logoya köprü oluşturularak URL linklerinin eklenmesiyle gerçekleştirilmelidir.
7. Uluslararası kısaltmalar kullanılabilir. Metin içinde mililitre için ml; dakika için dak. olarak belirtilen şekliyle yazılmalıdır.
8. Birimler metrik sistemi kullanılarak ifade edilmelidir.
9. Bütün tablo ve şekiller metin içindeki yerlerine yazım alanından taşmadan yerleştirilmiş olmalıdır.
10. Tablolar üstlerine, şekiller (formül, grafik, şema, spektrum, kromatogram, fotoğraf vb.) de altlarına arabik rakamlarla (**Şekil 1.**, **Tablo 2.**) numaralandırılmalı ve metin içinde yer verilmelidir. “Tablo”, “Şekil” sözcükleri ile bunlara ait numaralar koyu yazılmalı ve 11 punto olmalıdır. Şekil/Resim (JPG formatında) makale içinde yerleşmiş ve resimler yüksek çözünürlükte olmalıdır. En yüksek baskı kalitesini sağlamak için şekilleriniz mümkün olan en yüksek çözünürlükte (300 dpi veya daha yüksek) JPEG formatında gönderilmelidir. Üzerinde oynanmış (parlaklık, kontrast, gama ayarı vb.) şekillerde şekil altı metninde yapılan ayarlar belirtilmelidir. Yazarlar, önceki makalelerinden alıntılanmış olsalar bile, diğer kaynaklardan herhangi bir görüntüyü çoğaltmak için ilgili yayıncılardan yazılı izin almalıdır.
11. **Tablo** başlıkları Tabloların üstüne ve iki yana yaslı ve bunların genişliğini aşmayacak şekilde 11 punto yazılmalıdır. Tabloya ait açıklama varsa tablonun altına boşluk bırakmadan 9 punto ile yazılmalıdır. Tablo içindeki metin 8-11 punto arasında yazılabilir. **Şekil** başlıkları ise Şekillerin altına birer satır aralıkla ortalı ve 11 punto yazılmalıdır. Tablo ve Şekiller metin içine yerleştirilirken metin ile aralarında net ayrımı sağlayacak kadar boşluk bırakılmalıdır.

Örnek tablolar için bakınız.

- Tüm satır ve sütun çizgileri yer almalı.
- Tablo tasarımı tüm makalede tek tip ve düz olmalı, herhangi bir renklendirme/gölgelendirme kullanılmamalıdır.
- Tablo içinde yer alan başlıklar **bold/koyu** renkte yazılmalıdır.

Tablo 1. Türlerle ait morfolojik özellikler

Bitki kısmı*	<i>C. nummularia</i>	<i>C. integerrimus</i>
Yaprak	Genişçe eliptik-orbikular, 0.9-2.5-(4) x 0.5-2.5-(3-5) cm	Orbikulardan ovata kadar farklı şekillerde, 1.2-(4-5) x 0.9-3 cm
Tohum	3.5-4 x 1-2 mm, koyu kahverengi	3-4 x 1.5-2 mm, açık kahverengi

*Açıklama: 9 punto, 1 aralık olmalı. Açıklama ile tablo bitiminde boşluk bırakılmamalıdır.

Tablo 2. Hastaların özellikleri

Demografik bilgiler	A grubu*	B grubu	C grubu
Erkek cinsiyet	10 (%30)	20 (%60)	10 (% 30)
Sigara kullanımı	20 (%60)	10 (%30)	20 (%60)

*Açıklama: 9 punto yazılmalıdır.

Örnek şekil;



Şekil 1. *C. nummularia*'nın genel görünüşü

12. Makalelerin bölümleri **BAŞLIK** (Türkçe ve İngilizce), **ÖZ**, **ABSTRACT**, **GİRİŞ**, **GEREÇ VE YÖNTEM**, **SONUÇ VE TARTIŞMA**, **TEŞEKKÜR** (varsa eklenmeli), **YAZAR KATKILARI**, **ÇIKAR ÇATIŞMASI**, **ETİK KURUL ONAYI** (varsa eklenmeli) ve **KAYNAKLAR** sırasına uygun olarak hazırlanmalıdır. Bu bölümler birbirlerinden 2 satır aralık ile ayrılmalıdır. Bu bölümleri ifade eden başlıklar (Makalenin ilk başlığı hariç) **12 punto ile koyu olarak büyük harflerle ve sayfanın solundan başlanarak** yazılmalıdır. Ana başlıklardan önce ve sonra sırasıyla 18 nk ve 6 nk aralık olmalıdır. Bölüm başlıkları ile metin arasında belirtilenin dışında ayrıca aralık **bırakılmamalıdır.**

- **BAŞLIK:** Türkçe ve İngilizce olarak büyük harf ve **ilk başlık** (Türkçe makalelerde Türkçe başlık, İngilizce makalelerde İngilizce başlık ilk başlıktır) **14 punto, koyu** ve ikinci başlık 12 punto, *italik* olarak yazılmalıdır. Başlık metine uygun, kısa, çalışmayı tanıtıcı ve açık ifadeli olmalıdır.
- **ÖZ** ve **ABSTRACT:** Türkçe (**ÖZ**) ve İngilizce (**ABSTRACT**) olarak makalelerin başında 200'er kelimeyi geçmeyecek şekilde 10 punto ile *italik* olarak ve **çerçeve** içinde

yazılmalıdır. Yabancı dilde yazılmış makalelerde önce **ABSTRACT** daha sonra mutlaka Türkçe olarak **ÖZ** bulunmalıdır. **ÖZ** ve **ABSTRACT** başlıkları 12 punto ve koyu yazılıp kendi içlerinde alt başlıklar halinde makalenin özeti sunulmalıdır. Her bir alt başlık 10 punto, koyu, normal ve 1 cm içerden başlayarak yazılmalıdır. **ÖZ** ve **ABSTRACT** 16 cm genişliğindeki kutucukta yer almalıdır.

Özgün makalelerde;

ÖZ için kullanılacak alt başlıklar:

Amaç: *Metin italik yazılmalıdır.*

Gereç ve Yöntem: *Metin italik yazılmalıdır.*

Sonuç ve Tartışma: *Metin italik yazılmalıdır.*

Anahtar Kelimeler: *Metin italik yazılmalıdır, alfabetik sıralama gözetilmelidir*

ABSTRACT için kullanılacak alt başlıklar:

Objective: *Metin italik yazılmalıdır.*

Material and Method: *Metin italik yazılmalıdır.*

Result and Discussion: *Metin italik yazılmalıdır.*

Keywords: *Metin italik yazılmalıdır, alfabetik sıralama gözetilmelidir*

Derleme makalelerde;

ÖZ için kullanılacak alt başlıklar:

Amaç: *Metin italik yazılmalıdır.*

Sonuç ve Tartışma: *Metin italik yazılmalıdır.*

Anahtar Kelimeler: *Metin italik yazılmalıdır, alfabetik sıralama gözetilmelidir*

ABSTRACT için kullanılacak alt başlıklar:

Objective: *Metin italik yazılmalıdır.*

Result and Discussion: *Metin italik yazılmalıdır.*

Keywords: *Metin italik yazılmalıdır, alfabetik sıralama gözetilmelidir*

- **Anahtar Kelimeler (Keywords):** En fazla 5 sözcükten oluşmalı, ilgili dilde alfabetik, *italik* olarak, yalnızca ilk anahtar sözcüğün ilk harfi büyük olacak şekilde (büyük harf kullanılarak yapılan kısaltmalar hariç) aralara virgül konularak yazılmalı son anahtar sözcükten sonra ise bir imla işareti **kullanılmamalıdır.**

- **METİN:** Orijinal türkçe makalede metin kısmı **GİRİŞ, GEREÇ VE YÖNTEM, SONUÇ VE TARTIŞMA** olmak üzere 3 ana başlıktan oluşmalıdır. Bu ana başlıkların tamamı 12 punto, **büyük harflerle** ve koyu olacak şekilde yazılmalıdır. Derleme makalelerde ise **GİRİŞ** ile **SONUÇ VE TARTIŞMA** ana başlıkları olmalı, diğer başlıklar yazarın belirleyeceği şekilde her kelimenin ilk harfi büyük diğerleri küçük ve koyu olacak şekilde yazılmalıdır. Alt başlıklar 11 punto, 1,5 satır aralık, **bold/koyu** yazılmalı ve sola dayalı olmalıdır Alt başlıklarda numaralandırma sistemi **kullanılmamalıdır.**
- **GİRİŞ:** Araştırmanın amacı ve konuyla ilgili çalışmaların yer aldığı bölüm olmalıdır.
- **GEREÇ VE YÖNTEM:** Kullanılan gereç belirtilerek, uygulanan yöntem hakkında gerekli bilgiler açıkça ifade edilmelidir. **Bileşiklerin karakterizasyonu** ayrı bir paragraf ile gösterilmeli ve yeni bileşiklerin saflıkları ve yapı aydınlatılmaları sağlanmalıdır. Eğer çalışmada hayvan ya da insan örnekleri/gönüllüler kullanılıyorsa, araştırmacılar tüm işlemlerin ilgili kanun ve kurumsal kılavuzlara uygun şekilde gerçekleştirildiğine ve uygun idari kurul tarafından bu işlemlerin onaylandığına ve Etik Kurul onayı alındığına dair ifadenin çalışma

içinde yer almasını sağlamalıdır. Etik Kurul onayının zorunlu olduğu çalışmalarda, etik kurul onayı alınan kurumun adı ve etik kurul onay numarası, gereç ve yöntem kısmında belirtilmelidir. Ayrıca, kullanılan protokol ve prosedürlerin etik olarak gözden geçirildiği ve onaylandığı, makalenin gereç ve yöntem bölümüne eklenmelidir. Detaylı bilgi için lütfen <http://journal.pharmacy.ankara.edu.tr/en/ethical-principles-and-publication-policy/> web sayfasını ziyaret ediniz.

- **SONUÇ VE TARTIŞMA:** Bulguların verilerle değerlendirildiği bölümdür.
 - Metinde sonuçlar (conclusions) başlığı yer **almamalıdır**.
- **TEŞEKKÜR:** Varsa araştırmayı destekleyen kuruluşa ve katkısı olan kişilere Yazarların Katkısından önce yer alan bu bölümde kısaca teşekkür edilebilir.
- **YAZAR KATKILARI:** Makalede yer alan yazarların katkısı yazarlar tarafından imzalanan Telif Hakkı Devir Sözleşmesi (*Copyright Transfer Agreement*) uyarınca, çıkar çatışması bildiriminden hemen önce, makalede yer alan isim sırası gözetilerek yazılmalıdır. Lütfen bu bildirim için açık ad ve soyad yerine aşağıdaki örnekte olduğu gibi yazarların baş harflerini kullanınız.

Örnek:

YAZAR KATKILARI

Kavram: İ.Y., M.M.H., C.H., K.B.; Tasarım: İ.Y., C.H., I.Ö.G., Ö.Ü.; Denetim: C.H., I.Ö.G., M.M.H., K.B.; Kaynaklar: Ö.Ü., Z.K., K.B., M.M.H., A.K., İ.A., G.A.G., B.G., B.K.; Malzemeler: I.Ö.G., B.E., G.A.G., B.K., D.Ç.P.; Veri Toplama ve/veya İşleme: A.K., Ö.Ü., M.K., A.S., D.Ç.P., T.C.Ş.T.; Analiz ve/veya Yorumlama: Ö.Ü., B.G., T.C.Ş.T., E.K.S.; Literatür Taraması: B.K., D.Ç.P., B.G., B.E.; Makalenin Yazılması: A.K., İ.A., T.C.Ş.T.; Kritik İnceleme: İ.Y., B.G., Ö.Ü., İ.A.; Diğer: İ.Y., A.K.

• **ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI**

Çıkar çatışması varsa ne şekilde olduğu açıkça beyan edilmelidir. Eğer yok ise “Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.” ifadesini kullanmalıdırlar.

• **ETİK KURUL ONAYI**

Çalışmanın sonunda kaynaklardan önce etik kurul onayı alınmışsa hangi kurumdan ve ne zaman alındığı onay numarası ile mutlaka belirtilmelidir.

- **KAYNAKLAR:** Kaynak yazım stili Amerikan Psikoloji Derneği’ne (APA) göre. Yazı karakteri “Times New Roman” ve 11 punto, “1” aralık, iki yana yaslı. Metinde, geçiş sırasına göre köşeli parantez içinde, örneğin: [1,2,...] gibi numaralandırılmalı ve metin sonunda bu numaralara göre sıralanmalıdır. Alt başlıkların yanına kaynak belirtilmemelidir. Tablo içinde kaynak bildirilmesi gerekiyorsa metin içinde verildiği gibi belirtilmelidir. Kaynaklar aşağıdaki örneklere uygun olarak **aralarında 1 satır boşluk bırakılarak yazılmalıdır**.
- **Makale için:** Yazarın soyadı, adının baş harfleri (Birden fazla adı olan yazarın her bir isminin baş harfinden sonra nokta konmalı ve arada boşluk bırakılmamalıdır. Birden fazla yazarların arasında virgül yer almalıdır. **Son yazar ile bir önceki yazar arasında “ve” kelimesi veya “&” sembolü kullanılmamalıdır.**), makalenin tam başlığı *derginin adı* (italik), *cilt no* (italik), varsa sayı no (parantez içinde), başlangıç ve bitiş sayfa numarası, yıl yazar isimlerinden sonra (parantez içinde) 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.** Her bir referansın sonuna [CrossRef] ekleyerek aşağıdaki formatta DOI numarasını köprü olarak giriniz.

[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90403-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90403-6)

Örnekler:

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(11), 1709 – 1715. [CrossRef]

Macedo, T., Ribeiro, V., Oliveira, A.P., Pereira, D.M., Fernandes, F., Gomes, N.G.M., Andrade, P.B. (2020). Anti-inflammatory properties of *Xylopiya aethiopyca* leaves: Interference with pro-inflammatory cytokines in THP-1-derived macrophages and flavonoid profiling. *Journal of Ethnopharmacology*, 248, 112312. [CrossRef]

• **Elektronik Makale için:**

Örnek:

Perneger, T.V., Giner, F. (1998). Randomized trial of heroin maintenance programme for adults who fail in conventional drug treatments. *British Medical Journal*, 317, from <http://www.bmj.com/cgi/content/full/317/7150/> Erişim tarihi: 14.03.2021

• **Web sitesi için:**

Örnek:

Clinical Pharmacology Web site. (2001). From <http://cpip.gsm.com/> Erişim tarihi: 14.03.2021.

• **Kitap için:** Yazarın soyadı, adının baş harfleri, kitabın adı, cilt no (varsa), kitabevi, yayımlandığı şehir, sayfa no, basıldığı yıl (parantez içinde) yazılmalıdır.

Örnek:

Franke, R. (1984). *Theoretical Drug Design Methods*, Elsevier, Amsterdam, p.130.

• **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.

Örnek:

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.

• **Tez için:** Yazarın soyadı, adının baş harfleri, yıl yazar isimlerinden sonra (parantez içinde) yazılıp nokta işareti konmalıdır. Ne tür tez olduğu belirtildikten sonra tezin başlığı, nerde yapıldığı yazılmalıdır.

Örnek:

Ahmed, J. (2008). PhD Thesis. *Pharmaceutical Botany investigations on Prangos Lindl. (Umbelliferae) growing in Konya province.* Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Ankara University, Ankara, Turkey.

Guide 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 in a foreign language (English, French, Spanish or German). 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.

Preparation of Manuscript

1. Texts must be written in A4 norm (21 x 29.7 cm).
2. Texts should be written with 1.5 line spacing, with 2.5 cm margins on the left and right sides of the A4 norm page, 3 cm margins each from the top and bottom edges (5 line spacing from the top on the first page). Articles accepted for publication will be directly uploaded to the system as a "Microsoft Word" file (online submission). The main text font should be "**Times New Roman**" and **11 pt**.
3. Page numbers **should not be specified** in the article.
4. Paragraph headings must **begin 1 cm inside**. Additional spaces should not be left between paragraphs.
5. On the title page, the name of the publication, the names of the author / authors, the full address of the correspondent author, telephone and fax numbers, e-mail address, if available, should be written and centered. It should be indicated by placing (*) above the surname of the corresponding author. Name, surname, full address, fax number, telephone number and e-mail address of this person should be specified at the bottom of the title page.
6. **Author's Name (first letter capital, others lowercase)** and **SURNAME (all capital letters)** should be written in bold, three lines spaced under the title, and without a title underneath. If there is more than one author, they should be written by separating them with a comma and leaving a space. The numbers to be placed on the surnames of the authors and the institution names and postal addresses (For example: Ankara University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, 06100, Ankara, Turkey) should be clearly written on the line just below the names.
 - **ORCID ID number must be declared for all authors.** ORCID IDs of the authors should be created by creating a hyperlink to the relevant logo and adding URL links.
7. International abbreviations may be used. ml for milliliter in the text; min. for minutes It should be written as specified.
8. Units should be expressed using the metric system.
9. All tables and figures should be placed in their places in the text without exceeding the writing area.
10. Tables should be numbered on the top, figures (formula, graph, chart, spectrum, chromatogram, photograph, etc.) and Arabic numbers (**Figure 1., Table 2.**) below them and should be included in the text. The words "Table", "Figure" and their numbers should be written in bold and in 11 pt. Figure / Picture (in JPG format) must be placed in the article and pictures must be in high resolution (300 dpi or higher). Authors must obtain written permission to reproduce any images from other sources.
11. **Table** titles should be written in 11 font size justified on the top of the tables and not exceeding their width. If there is an explanation for the table, it should be written in 9 font size without leaving any space at the bottom of the table. The text in the table can be written between 8-11 points. **Figure titles** should be written at the bottom of the figures with a line spacing, centered and 11 pt. While placing tables and figures in the text, enough space should be left to provide clear separation from the text.

See for below examples for tables:

- All row and column lines should be included.
- Table design should be uniform and straight throughout the article, no coloring / shading should be used.
- Headings in the table should be written in **bold**.

Table 1. Morphological characteristics of the species

Plant part*	<i>C. nummularia</i>	<i>C. integerrimus</i>
Leaf	Broadly elliptical-orbicular, 0.9-2.5-(4) x 0.5-2.5-(3-5) cm	From orbicular to ovate, 1.2-(4-5) x 0.9-3 cm,
Seed	3.5-4 x 1-2 mm, dark brown	3-4 x 1.5-2 mm, light brown

* Explanation should be 9 font size, 1 range. There should not be any space between end of the table and the explanation.

Table 2. Patient demographics

Demographics	Group A*	Group B	Group C
Male gender	10 (%30)	20 (%60)	10 (% 30)
Cigarette consumption	20 (%60)	10 (%30)	20 (%60)

* Explanation should be 9 font size, 1 range. There should not be any space between the end of the table and the explanation.

Example for figure:



Figure 1. General view of *C. nummularia*

12. The sections of the articles should be prepared in accordance with the **TITLE** (Turkish and English), **ABSTRACT**, **INTRODUCTION**, **MATERIAL AND METHOD**, **RESULT AND DISCUSSION**, **ACKNOWLEDGEMENTS** (if available), **AUTHOR CONTRIBUTIONS**, **CONFLICT OF INTEREST**, **ETHICS COMMITTEE APPROVAL** (if available) and **REFERENCES**. These sections should be separated from each other by 2 line spacing. Titles expressing these sections (except the first title of the article) should be written in **12 pt, bold capital letters and starting from the left of the page**. There should be 18 nk and 6 nk intervals, respectively, before and after the main headings. Between the chapter titles and the text, a separate space **should not be left** other than the specified one.

- **TITLE:** Capital letters and **first title** in Turkish and English (Turkish title is the first title in Turkish articles, English title is the first title in English articles), **14 pt, bold** and the second title should be written in 12 pt, *italic*. The title should be appropriate to the text, short, introducing the work and clearly worded.
- **ABSTRACT** and **ÖZ:** It should be written in English (**ABSTRACT**) and Turkish (**ÖZ**) at the beginning of the articles, not exceeding 200 words, 10 pt, *italic* and within a frame. In articles written in a foreign language, first **ABSTRACT** and then **ÖZ** in Turkish. **ABSTRACT** and **ÖZ** titles should be written in 12 pt. And bold and the summary of the article should be presented as subheadings. Each subtitle should be written in 10 pt, bold,

normal and 1 cm indented. **ABSTRACT** and **ÖZ** should be placed in the box of 16 cm width.

For original articles;

Subheadings to be used for **ABSTRACT**:

Objective: *Text should be written in italic.*

Material and Method: *Text should be written in italic.*

Result and Discussion: *Text should be written in italic.*

Keywords:

Subheadings to be used for **ÖZ**:

Amaç: *Text should be written in italic.*

Gereç ve Yöntem: *Text should be written in italic.*

Sonuç ve Tartışma: *Text should be written in italic.*

Anahtar Kelimeler: *Text should be written in italic.*

For review articles;

Subheadings to be used for **ABSTRACT**:

Objective: *Text should be written in italic.*

Result and Discussion: *Text should be written in italic.*

Keywords:

Subheadings to be used for **ÖZ**:

Amaç: *Text should be written in italic.*

Sonuç ve Tartışma: *Text should be written in italic.*

Anahtar Kelimeler:

- **Keywords (Anahtar Kelimeler):** It should consist of a maximum of 5 words, should be written alphabetically, italic in the relevant language, with only the first letter of the first keyword capitalized (except for abbreviations using capital letters) with commas between them and a spelling mark **should not be** used after the last keyword.
- **TEXT:** The text part of the original Turkish article should consist of 3 main headings: **INTRODUCTION, MATERIAL AND METHOD, RESULT AND DISCUSSION**. All of these main headings should be written in 12 pt, **capital letters** and bold. In review articles, there should be the main headings of **INTRODUCTION** and **CONCLUSION AND DISCUSSION**, other titles should be written with the first letter of each word capital, the others in lowercase and bold, as determined by the author. Subheadings should be written in 11 font size, 1.5 line spacing, **bold** and aligned to the left. Numbering system **should not be** used in subheadings.
- **INTRODUCTION:** There should be a section containing the purpose of the research and studies on the subject.
- **MATERIAL AND METHOD:** Required information about the method should be clearly stated by indicating the material used. **Characterization of compounds** should be shown in a separate paragraph and clarification of the purity and structure of the new compounds should be provided. If animal or human samples / volunteers are used in the study, researchers should ensure that a statement stating that all procedures are carried out in accordance with the relevant laws and institutional guidelines and that these procedures have been approved by the appropriate administrative committee and that the approval of the Ethics Committee is included in the study. In studies for which Ethics Committee approval is mandatory, the name of the institution for which the ethics committee approval was obtained and the ethics committee approval number should be specified in the materials and methods section. It should also be included in the materials and methods section of the article that the protocols and procedures used are ethically reviewed and approved. For

detailed information, please visit <http://journal.pharmacy.ankara.edu.tr/en/ethical-principles-and-publication-policy/> web page.

- **RESULT AND DISCUSSION:** This is the section where findings are given and evaluated.
 - The title of conclusions **should not be** included in the text.
- **ACKNOWLEDGMENTS:** If any, the organization supporting the research and the people who contributed can be acknowledged briefly in this section prior to the Authors' Contribution.
- **AUTHOR CONTRIBUTIONS:** Contribution of the authors in the article should be written just before the conflict of interest notification, in accordance with the *Copyright Transfer Agreement* signed by the authors. Please use the initials of the authors for this notice instead of the full name and surname as in the example below.

Example:

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: *İ.Y., M.M.H., C.H., K.B.*; Design: *İ.Y., C.H., I.Ö.G., Ö.Ü.*; Control: *C.H., I.Ö.G., M.M.H., K.B.*; Sources: *Ö.Ü., Z.K., K.B., M.M.H., A.K., İ.A., G.A.G., B.G., B.K.*; Materials: *I.Ö.G., B.E., G.A.G., B.K., D.Ç.P.*; Data Collection and / or Processing: *A.K., Ö.Ü., M.K., A.S., D.Ç.P., T.C.Ş.T.*; Analysis and / or Interpretation: *Ö.Ü., B.G., T.C.Ş.T., E.K.S.*; Literature Review: *B.K., D.Ç.P., B.G., B.E.*; Manuscript Writing: *A.K., İ.A., T.C.Ş.T.*; Critical Review: *İ.Y., B.G., Ö.Ü., İ.A.*; Other: *İ.Y., A.K.*

- **CONFLICT OF INTEREST**

If there is a conflict of interest, it should be clearly declared in what form it is. If not, "The authors declare that there is no real, potential, or perceived conflict of interest for this article." They should use the expression.

- **ETHICS COMMITTEE APPROVAL**

If the ethics committee approval is obtained before the sources at the end of the study, the approval number must be specified from which institution and when it was obtained.

- **REFERENCES:** Bibliography style is according to the American Psychological Association (APA). Typeface "Times New Roman" and 11 font size, "1" spacing, justified. In the text, it should be numbered in square brackets according to the order of appearance, such as: [1,2,...] and listed according to these numbers at the end of the text. Reference should not be given next to the subtitles. If it is necessary to provide a source in the table, it should be specified as given in the text. References should be written in accordance with the examples below, **with 1 line space between them.**

- **For the article:** Author's surname, the initials of the name (There should be a period after the initial letter of each name of the author with more than one name, and there should not be a space in between. **There should not be "and" between the last author and the previous author. The "&" symbol should not be used.** The full title of the article should be written as the *name of the journal (italic)*, *volume number (italic)*, if available, the number (in brackets), the beginning and ending page number, the year after the author names (in parentheses). **If there is more than one author, all of them**

should be written. While writing the name of the article, the first letter of the first word should be capitalized and the first letter of the other words should be written in lowercase. Journal names given in references should be written clearly without abbreviation. Add the [CrossRef] sign at the end of each reference and enter the DOI number as a hyperlink with the right click in the format below.

[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90403-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90403-6)

Examples:

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(11), 1709 – 1715. [CrossRef]

Macedo, T., Ribeiro, V., Oliveira, A.P., Pereira, D.M., Fernandes, F., Gomes, N.G.M., Andrade, P.B. (2020). Anti-inflammatory properties of *Xylopia aethiopica* leaves: Interference with pro-inflammatory cytokines in THP-1-derived macrophages and flavonoid profiling. *Journal of Ethnopharmacology*, 248, 112312. [CrossRef]

- **Online articles:**

Example:

Perneger, T.V., Giner, F. (1998). Randomized trial of heroin maintenance programme for adults who fail in conventional drug treatments. *British Medical Journal*, 317, from [http://www.bmj.com/cgi/content/full/317/7150/](http://www.bmj.com/cgi/content/full/317/7150) Retrieved August 12, 2005

- **Web sites:**

Example:

Clinical Pharmacology Web site. (2001). Retrieved June 16, 2004, from <http://cpip.gsm.com/>. Accessed date 14.03.2021.

- **Books:** The surname of the author, the initials of the name, the name of the book, volume number (if any), the bookstore, the city where it was published, the page number, the year it was published (in parentheses) should be written.

Example:

Franke, R. (1984). *Theoretical Drug Design Methods*, Elsevier, Amsterdam, p.130.

- **Book chapters:** Author's surname, initials of the name, the title of the section, the editor / editors' surname, the initials of the name, the phrase (Ed./Eds.), The title of the book, if any, the book house, the city where it was published, the page number, the year it was published (in parentheses) should be written.

Example:

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.

- **For the thesis:** The surname of the author, the initials of the name, the year should be written (in parentheses) after the author's names and a full stop. After specifying the type of thesis, the title of the thesis and where it was made should be written.

Example:

Ahmed, J. (2008). PhD Thesis. *Pharmaceutical Botany investigations on Prangos Lindl. (Umbelliferae) growing in Konya province*. Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Ankara University, Ankara, Turkey.

ANKARA ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ DERGİSİ

YAYIN SAHİBİNİN ADI : Prof. Dr. Asuman BOZKIR
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

- Andrii A. SAFONOV, Alina V. NEVMYVAKA, Olexandr I. PANASENKO, Yevgeniy G. KNYSH - **MICROWAVE SYNTHESIS OF 3- AND 4-SUBSTITUTED-5-(3-PHENYLPROPYL)THIO)-4H-1,2,4-TRIAZOLES** - 3- VE 4-SÜBSTİTÜE-5-(3-FENİLPROPİL)TİYO)-4H-1,2,4-TRİAZOLLERİN MİKRODALGA SENTEZİ 457
- Aarthi Kundam VASUDEVAN, Hemamalini RAJAGOPAL, Sambanthan MUTHU, Fazilath Basha ASIF, Badiadka NARAYANA - **STRUCTURAL AND PHARMACEUTICAL EVALUATION OF 4-HYDROXY-BENZAMIDE DERIVATIVE: ANTI-BACTERIAL AND ANTI-VIRAL POTENT** - 4-HİDROKSİ-BENZAMİD TÜREVİNİN YAPISAL VE FARMASÖTİK DEĞERLENDİRMESİ: ANTI-BAKTERİYAL VE ANTI-VİRAL ETKİ 467
- Gülderen YILMAZ, Gözde ÖZTÜRK, Betül DEMİRCİ - **TÜRKİYE'DE DOĞAL OLARAK YETİŞEN *CELTIS AUSTRALIS* L. VE *C. TOURNEFORTII* LAM. (CANNABACEAE) MEYVELERİNİN YAĞ ASİTİ BİLEŞİMLERİ VE ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ** - EVALUATION OF FATTY ACID COMPOSITIONS AND ANTIMICROBIAL EFFECTS OF *CELTIS AUSTRALIS* L. AND *C. TOURNEFORTII* LAM. (CANNABACEAE) NATURALLY DISTRIBUTED IN TURKEY 480
- Sinan BULUT, Emrah BİLGENER - **TÜRKİYE'DE YARDIMCI ECZACILIK UYGULAMASI: ECZACILARIN PERSPEKTİFİ** - ASSISTANT PHARMACIST PRACTICES IN TURKEY: PHARMACISTS' PERSPECTIVES 491
- Roman SHCHERBYNA, Olexandr PANASENKO, Olha POLONETS, Natalia NEDOREZANIUK, Maryna DUCHENKO - **SYNTHESIS, ANTIMICROBIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF YLIDENHYDRAZIDES OF 2-((4-R-5-R1-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-YL)THIO)ACETALDEHYDES** - 2-((4-R-5-R1-4H-1,2,4-TRİAZOL-3-İL)TİYO)ASETALDEHİTLERİN İLİDENHİDRAZİDLERİNİN SENTEZİ, ANTİMİKROBİYAL VE ANTİFUNGAL AKTİVİTESİ 504
- Hilal Basak EROL, Banu KASKATEPE - **ISOLATION OF NEWLY ISOLATED VB_K1 BACTERIOPHAGE AND INVESTIGATION OF SUSCEPTIBILITY ON ESBL POSITIVE KLEBSIELLA SPP. STRAINS** - YENİ İZOLE EDİLEN VB_K1 BAKTERİYOFAJININ İZOLASYONU VE ESBL POZİTİF KLEBSİELLA TÜRLERİ ÜZERİNE DUYARLILIĞININ ARAŞTIRILMASI 515
- Falah Saleh MOHAMMED, Nuh KORKMAZ, Mehmet DOĞAN, Ali Erdem ŞABİK, Mustafa SEVİNDİK - **SOME MEDICINAL PROPERTIES OF *GLYCYRRHIZA GLABRA* (LICORICE)** - *GLYCYRRHIZA GLABRA*'NIN BAZI TIBBİ ÖZELLİKLERİ (MEYAN KÖKÜ) 524
- Özgür ÜSTÜNDAĞ, Erdal DİNÇ - **SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF ACTIVE COMPOUNDS IN AN ANTIHYPERTENSIVE FORMULATION BY HAAR-CWT METHOD** - BİR ANTİHİPERTANSİF FORMÜLASYONDAKİ AKTİF BİLEŞİKLERİN HAAR-CWT YÖNTEMİYLE SPEKTROFOTOMETRİK TAYİNİ 535
- Özgür ÜSTÜNDAĞ, Erdal DİNÇ - **VALIDATION STUDY OF A SPECTROPHOTOMETRIC BINARY MIXTURE ANALYSIS** - BİR SPEKTROFOTOMETRİK İKİLİ KARIŞIM ANALİZİNİN DOĞRULAMA ÇALIŞMASI 545

Nuh KORKMAZ, Alpaslan DAYANGAÇ, Mustafa SEVİNDİK - ANTIOXIDANT, ANTIMICROBIAL AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITIES OF GALIUM APARINE - GALIUM APARINE'NİN ANTİOKSİDAN, ANTİMİKROBİYAL VE ANTİPROLİFERATİF AKTİVİTELERİ	554
Begüm EVRANOS AKSÖZ - MOLECULAR DOCKING STUDIES ON SOME 4,5-DIHYDRO-1H-PYRAZOLE DERIVATIVES AS CYCLOOXYGENASE INHIBITORS - SİKLOOKSİJENAZ İNHİBİTÖRLERİ OLARAK BAZI 4,5-DİHİDRO-1H-PİRAZOL TÜREVLERİ ÜZERİNDE MOLEKÜLER DOKİNG ÇALIŞMALARI	565
Safa GÜMÜŞOK, Sezen YILMAZ SARIALTIN, Tülay ÇOBAN, Ceyda Sibel KILIÇ - A PRELIMINARY STUDY ON THE ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF OPOANAX HISPIDUS - OPOANAX HISPIDUS'UN ANTİOKSİDAN VE ANTI-İNFLAMATUAR AKTİVİTELERİ ÜZERİNE BİR ÖN ÇALIŞMA	577
Derlemeler / Reviews	
Muhammed Mesud HÜRKUL - ANTEP FISTIĞI (PISTACIA VERA L.) MEYVE KABUĞU: BİYOAKTİF BİLEŞİKLER İÇİN POTANSİYEL KAYNAK - PISTACHIO (PISTACIA VERA L.) FRUIT HULL: POTENTIAL SOURCE FOR BIOACTIVE COMPOUNDS	586
Yurii G. SAMELIUK, Fadi AL ZEDAN, Tetyana M. KAPLAUSHENKO - 1,2,4-TRIAZOLE DERIVATIVES IN MEDICINE AND PHARMACY AND APPLICATION PROSPECTS - TIP VE ECZACILIK ALANINDAKİ 1,2,4-TRİAZOL TÜREVLERİ VE UYGULAMA ÖNERİLERİ	598
Hemlata DANGI, Ratnesh DAS, Sushil KASHAW - SYNTHESIS OF INDOLES DERIVATIVES USING METAL FREE CATALYST IN ORGANIC REACTIONS - ORGANİK REAKSİYONLARDA METAL İÇERMİYEN KATALİZÖR KULLANILARAK İNDOL TÜREVLERİNİN SENTEZİ	615
Özge BALPINAR, Selim AYTAÇ - TIBBİ KENEVİR VE SAĞLIK: FARMAKOLOJİK BİR DERLEME - MEDICAL CANNABIS AND HEALTH: A PHARMACOLOGICAL REVIEW	631
Seren GÜNDOĞDU, Ümmügülüm UÇAR, Ayşe KURUÜZÜM UZ - RESVERATROLÜN BULUNDUĞU KAYNAKLAR VE TIBBİ ÖNEMİ - SOURCES OF RESVERATROL AND ITS MEDICINAL SIGNIFICANCE	652
Hilal Ahsen TUNÇAY, Gülen İrem KAYA - ALOE VERA (L.) BURM. F. (SARISABİR) BİTKİSİNİN FİTOTERAPİDE KULLANIMI - USAGE OF ALOE VERA (L.) BURM. F. (SARISABİR) PLANT IN PHYTOTHERAPY	674
Ömer YEDİKAYA, F. Ulya BADILLI - İN VİTRO DERİ MODELLERİ - IN VITRO SKIN MODELS	699
Ayşegül KOÇYİĞİT, Benay CAN EKE - KARBONMONOKSİT ZEHİRLENMELERİNDE POSTMORTEM DEĞİŞİKLİKLER - POSTMORTEM CHANGES IN CARBON MONOXIDE POISONING	722