

eISSN: 2564-6524
ISSN: 1015-3918 (1971-2010)



ANKARA ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
DERGİSİ

JOURNAL OF FACULTY OF PHARMACY
OF
ANKARA UNIVERSITY

Cilt / Vol : 46
Sayı / No : 1
Yıl / Year : 2022

eISSN: 2564-6524
ISSN: 1015-3918 (1971-2010)



ANKARA ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
DERGİSİ

JOURNAL OF FACULTY OF PHARMACY
OF
ANKARA UNIVERSITY

Cilt / Vol: 46
Sayı / No: 1
Yıl / Year: 2022

ANKARA ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ DERGİSİ

(Ankara Ecz. Fak. Derg.)

eISSN: 2564-6524

ISSN: 1015-3918 (1971-2010)

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

efd.editor@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

Dr. Aysu SELÇUK

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Klinik Eczacılık Anabilim Dalı

e-posta: aysuselcuk@ankara.edu.tr

Dr. M. Mesud HÜRKUL

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı

e-posta: mhurkul@ankara.edu.tr

Alan Editörleri:

Prof. Dr. Özge ÜLKER

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

Doç. Dr. İlker ATEŞ

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

Doç. Dr. Özgür ÜSTÜNDAĞ

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı
e-posta: ustundag@pharmacy.ankara.edu.tr*

Doç. Dr. Ceyda Tuba ŞENGEL TÜRK

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
e-posta: ctsengel@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. Öğr. Üyesi Burçin ERGENE

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

Uzm. Ecz. Melek KARACAOĞLU

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

Ecz. Muammer ÇALIKUŞU

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık İşletmeciliği Anabilim Dalı
e-posta: mcalikusu@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 *İvane Javakhishvili 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. İlkey 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 YEĞENOĞLU *Hacettepe Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*
Prof. Dr. Sevgi AKAYDIN *Gazi Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*
Prof. Dr. Sibel Aysıl 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 bilimler alanındaki 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)
- TR Dizin

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

JOURNAL OF FACULTY OF PHARMACY OF ANKARA UNIVERSITY

(J. Fac. Pharm. Ankara)

eISSN: 2564-6524

ISSN: 1015-3918 (1971-2010)

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: iyildiz@pharmacy.ankara.edu.tr

efd.editor@ankara.edu.tr

Associate Editors:

Prof. Dr. Canan HASÇIÇEK

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

Dr. Aysu SELÇUK

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Clinical Pharmacy

e-mail: aysuselcuk@ankara.edu.tr

Dr. M. Mesud HÜRKUL

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany

e-mail: mhurkul@ankara.edu.tr

Section Editors:

Prof. Dr. Özge ÜLKER

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Toxicology

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

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. 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. Aşlı KOÇ

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry

e-mail: akoc@ankara.edu.tr

Assist. Prof. Burçin ERGENE

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy

e-mail: ergene@pharmacy.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

Pharm. MSc. Melek KARACAOĞLU

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy

e-mail: mkaracaoğlu@ankara.edu.tr

Pharm. Muammer ÇALIKUŞU

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

e-mail: calikusu@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 ÖZCELİKAY *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 TOTH *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. őukran 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)
- TR Dizin

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

İÇİNDEKİLER / CONTENTS 46(1), 2022

Özgün Makaleler / Original Articles

Sayfa / Page

- Bayram NALLI, Şükran KÖSE, Ömer DEMİR, Elvan GÖKMEN, Esra ÖZDAĞ, Aliye MANDIRACIOĞLU - **ECZACILARDA COVID-19 VE TEDAVİSİNE YÖNELİK BİLGİ DÜZEYİ ÖLÇÜLMESİ** - MEASURING THE KNOWLEDGE LEVEL OF COVID-19 AND ITS TREATMENT IN PHARMACISTS 1
- Mehmet Evren OKUR, Ayşe Esra KARADAĞ, Rengin REİS, Hande SİPAHİ, Rana ARSLAN, Betül DEMİRCİ, Fatih DEMİRCİ - **PHYTOCHEMICAL AND IN VITRO PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF *PHLOMIS PUNGENS*** - *PHLOMIS PUNGENS*'İN FITOKİMYA VE *İN VİTRO* FARMAKOLOJİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ 11
- Dilan KONYAR, Hayati OKUR, Zehra ARSLAN - **MOLECULAR DOCKING STUDIES OF COX INHIBITORS ON WILD-TYPE RAS** - COX İNHİBİTÖRLERİNİN YABANI-TİP RAS ENZİMİ ÜZERİNDE MOLEKÜLER DOKİNG ÇALIŞMALARI 23
- Suzan ÖKTEN, Alparslan Semih SALAN, Gülcan KUYUCUKLU, Fatma KAYNAK ONURDAĞ - **ACINETOBACTER SPP. İZOLATLARINDA DIŞA ATIM POMPASI (DAP) İNHİBİTÖRLERİNİN MEROPENEMİN ETKİNLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ** - EFFECT OF EFFLUX PUMP (DAP) INHIBITORS TO EFFICACY OF MEROPENEM ON ACINETOBACTER SPP. CLINICAL ISOLATES 35
- Hande YÜCE, Neşe Başak TÜRKMEN, Dilan Aşkın ÖZEK, Songül ÜNÜVAR - **TAURİN, KAPSAİSİN, MELATONİN VE BETA KAROTENİN L929 SAĞLIKLI HÜCRELER VE MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİPROLİFERATİF, ANTİMİGRASYON VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI** - THE INVESTIGATION OF THE ANTIPROLIFERATIVE, ANTIMIGRATION AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF TAURINE, CAPSAICIN, MELATONIN AND BETA CAROTEN ON L929 HEALTHY CELLS AND MCF-7 BREAST CANCER CELLS 48
- Sarah GADO, Zeynep ATEŞ ALAGOZ - **RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE (RDRP) INHIBITOR DRUGS AGAINST SARS-COV-2: A MOLECULAR DOCKING STUDY** - SARS-COV-2'YE KARŞI RNA-BAĞIMLI RNA POLİMERAZ (RDRP) İNHİBİTÖR İLAÇLARI: BİR MOLEKÜLER DOCKİNG ÇALIŞMASI 62
- Aslı KOÇ, Ekin KURTUL, Arzu Zeynep KARABAY, Mehmet TEKİN, Özlem BAHADIR ACIKARA - **CYTOTOXIC AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF *ALCHEMILLA MOLLIS* (BUSER) ROTHM. AND ITS CONTITUENTS; HYPEROSIDE AND ISOQUERCETIN** - *ALCHEMILLA MOLLIS* (BUSER) ROTHM. İLE BİLEŞENLERİ HİPEROZİT VE İZOKERSETİNİN SİTOKSİK VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİ 78
- Muni Sireesha SUNKARA, Dharani ANNEPALLY, Donna Kanthi BITLA, Sushma BOPPY, Pallavi CHIDURALA, Jhansi CHILUKA, Saritha Jyostna TANGEDA - **TARGETTING THE 3BGQ - PIM1 KINASE INTERACTION WITH A SERIES OF NOVEL DITHIOCARBAMATE SUBSTITUTED 2-OXOINDOLE DERIVATIVES - IN SILICO STUDIES** - 3BGQ - PIM1 KİNAZ ETKİLEŞİMİNİ HEDEF ALAN YENİ DİTİYOKARBAMAT İLE SÜBSTİTÜE 2-OKSOİNDOL TÜREVLERİNİN *İN SİLİKO* ÇALIŞMALARI 86
- Şükran ÖZTÜRK, Sulhiye YILDIZ - **DETERMINATION OF *UREAPLASMA UREALYTICUM* AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY IN SEXUALLY ACTIVE WOMEN WITH DIFFERENT METHODS** - CİNSEL YÖNDEN AKTİF KADINLARDA *UREAPLASMA UREALYTICUM* VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIĞININ FARKLI YÖNTEMLERLE

BELİRLENMESİ	103
Murat ZOR, Sultan PEKACAR, Didem DELİORMAN ORHAN - NASTURTUM OFFICINALE 'NİN FİTOKİMYASAL İÇERİĞİ, ANTİOKSİDAN VE ENZİM İNHİBİTÖR ETKİLERİ - PHYTOCHEMICAL CONTENT, ANTIOXIDANT AND ENZYME INHIBITORY EFFECTS OF <i>NASTURTUM OFFICINALE</i>	114
Çiğdem YAVAŞ, Fatma KAYNAK-ONURDAĞ, Suzan ÖKTEN - ARE THE DISINFECTANTS USED IN HOSPITALS ALSO EFFECTIVE ON BACTERIA THAT CAUSE NOSOCOMIAL INFECTIONS?: A UNIVERSITY HOSPITAL INVESTIGATION - HASTANEDE KULLANILAN DEZENFEKTANLAR NOZOKOMİYAL ENFEKSİYON ETKENİ BAKTERİLER ÜZERİNE DE ETKİLİ Mİ?: BİR ÜNİVERSİTE HASTANESİ GÖZLEMİ	129
Muni Sireesha SUNKARA, Vinutha KUCHANA, Neelima KUDUMULA - MOLECULAR DOCKING STRATEGY FOR MULTI-TARGET INHIBITOR DISCOVERY OF SELECTED PLANT CONSTITUENTS IN BAUHINIA ACUMINATA - <i>BAUHINIA ACUMINATA</i> 'DAKİ SEÇİLMİŞ FİTO BİLEŞENLERİN ÇOK HEDEFLİ İNHİBİTÖR KEŞFİ İÇİN MOLEKÜLER YERLEŞTİRME STRATEJİSİ	144
Merve Eylül KIYMACI, Kenan Can TOK, Muhammed Mesud HÜRKUL - A STUDY ON PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF QUERCUS MACRANTHERA SUBSP. SYSPIRENSIS (K. KOCH) MENITSKY BRANCH AND LEAF EXTRACTS - <i>QUERCUS MACRANTHERA</i> SUBSP. <i>SYSPIRENSIS</i> (K. KOCH) MENITSKY'İN DAL VE YAPRAK EKSTRELERİNİN FİTOKİMYASAL ANALİZİ VE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA	160
Eldrin DLR. ARGUELLES - TOTAL PHENOLIC CONTENT AND IN VITRO ANALYSIS OF ANTIOXIDANT, ANTIBACTERIAL, AND ALPHA-GLUCOSIDASE INHIBITION PROPERTIES OF CHROOCOCCUS MINUTUS (KÜTZING) NÄGELI (CHROOCOCCALES, CYANOBACTERIA) - <i>CHROOCOCCUS MINUTUS</i> (KÜTZING) NÄGELI'NİN (CHROOCOCCALES, CYANOBACTERIA) ANTİOKSİDAN, ANTİBAKTERİYEL VE ALFA-GLUKOZİDAZ İNHİBİSYON ÖZELLİKLERİNİN TOPLAM FENOLİK İÇERİĞİ VE İN VİTRO ANALİZİ	170
Derlemeler / Reviews	
Mevlüt AKDAĞ, Azime Berna ÖZÇELİK - GENİŞ SPEKTRUMLU ANTİKANSER BİLEŞİKLER GELİŞTİRMEYE YÖNELİK POTANSİYEL BİR HEDEF: HEKSOKİNAZ-II - A POTENTIAL TARGET FOR DEVELOPING BROAD SPECTRUM ANTICANCERS: HEXOKINASE-II	182
Gülnur ARSLAN, Tijen ÖNKOL, Azime Berna ÖZÇELİK - SİKLİN BAĞIMLI KİNAZ 4/6 VE İNHİBİTÖRLERİ - CYCLIN DEPENDENT KINASE 4/6 AND INHIBITORS	193
Dorukhan HIŞIR, Meliha EKİNCİ, Derya İLEM-ÖZDEMİR - HEDEFE YÖNELİK TEDAVİDE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR: LUTESYUM-177 İLE İŞARETLİ RADYOFARMASÖTİKLER - CURRENT APPROACHES TO TARGETED THERAPY: LUTETIUM-177 LABELED RADIOPHARMACEUTICALS	209
Mustafa BUĞDAYCI, Leyla YUMRUKAYA, Selen YEĞENOĞLU - SAĞLIK KURUMLARINA YAPILAN GERİ ÖDEME YÖNTEMLERİNİN SAĞLIK EKONOMİSİ PERSPEKTİFİNDEN İNCELENMESİ - THE REVIEW OF METHODS OF REIMBURSEMENT TO HEALTH INSTITUTIONS FROM THE POINT OF HEALTH ECONOMICS	231
Hatice DEMİRTAŞ, Ceyda Tuba SENDEL-TURK - YENİ NESİL LİPİT BAZLI İLAÇ TAŞIYICI	

**SİSTEMLER: LİPİT NANOKAPSÜLLER - NEW GENERATION LIPID-BASED
DRUG DELIVERY SYSTEMS: LIPID NANOCAPSULES**

239

Ayşe ARAS, Mijde ERYILMAZ - **KOZMETİK ÜRÜNLERDE GÖRÜLEN MİKROBİYOLOJİK
KONTAMİNASYONLAR - MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION OF
COSMETIC PRODUCTS**

262



ECZACILARDA COVID-19 VE TEDAVİSİNE YÖNELİK BİLGİ DÜZEYİ ÖLÇÜLMESİ

MEASURING THE KNOWLEDGE LEVEL OF COVID-19 AND ITS TREATMENT IN PHARMACISTS

Bayram NALLI¹ , Şükran KÖSE^{2*} , Ömer DEMİR³ , Elvan GÖKMEN⁴ ,
Esra ÖZDAĞ⁴ , Aliye MANDIRACIOĞLU⁵ 

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İzmir Tepecik Eğitim Araştırma Hastanesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi
Kliniği, 35780, İzmir, Türkiye

²Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İzmir Tepecik Eğitim Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve
Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, 35780, İzmir, Türkiye

³Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İzmir Tepecik Eğitim Araştırma Hastanesi, Tıbbi Farmakoloji, 35780,
İzmir, Türkiye

⁴Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İzmir Tepecik Eğitim Araştırma Hastanesi, Eczane, 35780, İzmir,
Türkiye

⁵Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Ana Bilim Dalı, 35100, İzmir, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, Türkiye’de görev yapan eczacıların COVID-19 hakkında bilgi düzeylerini ölçmektir.

Gereç ve Yöntem: Yazarları tarafından literatürün kapsamlı bir incelemesinden sonra geliştirilen 16 soruluk doğru-yanlış şeklinde olan online anket Google formu kullanılarak sosyal medya ve profesyonel platformlar (WhatsApp, Gmail, Instagram, LinkedIn gibi) aracılığı ile eczacılara ulaştırılmıştır. Tüm Türkiye’den anketi tam dolduran 364 eczacı çalışma kapsamında yer almıştır.

Sonuç ve Tartışma: Türkiye’de gerçekleştirilen bu çalışmada eczacılar % 99.5’unun iyi bilgi düzeyine sahip olduğu belirlenmiştir. COVID-19 bilgi düzeyini etkileyen faktörler incelendiğinde çalışmamızda, homojen bir şekilde bilgi düzeyi yüksek olduğu için bağımsız değişkenler ile bir ilişki saptanmamıştır. Literatürde yaş, meslekte deneyim yılı, yüksek lisans ve doktora eğitimine sahip olma ile daha iyi bilgi, deneyim süresi ile bilgi

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Şükran KÖSE
e-posta / e-mail: sukrankose@yahoo.com

düzeyinin ilişkili olduğu bildirilmekte iken bazı çalışmalarda da hiç bir özelliğin ilişkili olmadığı belirtilmektedir. Ancak Kesitsel çalışma olması neden- sonuç ilişkisini açıklamada kısıtlılık yaratmaktadır. Katılımcı sayısının örnekleme karşılamakla birlikte daha fazla olabilmesi arzu edilebilirdi.

Anahtar Kelimeler: *Bilgi düzeyi, COVID-19, eczacılar, pandemi*

ABSTRACT

Objective: *The aim of this study is to measure the knowledge level of pharmacists working in Turkey about COVID-19*

Material and Method: *The online questionnaire consisting of 16 questions in the form of true-false, developed by the authors after a comprehensive review of the literature, was delivered to pharmacists via social media and professional platforms (such as WhatsApp, Gmail, Instagram, LinkedIn) using the Google form. 364 pharmacists from all over Turkey who filled out the questionnaire were included in the study.*

Result and Discussion: *In this study carried out in Turkey, it was determined that 99.5% of the pharmacists had good knowledge. When the factors affecting the level of knowledge of COVID-19 were examined, in our study, no relationship was found with the independent variables since the level of knowledge was homogeneously high. In the literature, it is reported that age, years of professional experience, having a master's and doctorate education are associated with better knowledge, while the length of experience is associated with the level of knowledge, while in some studies it is stated that no feature is related. However, the fact that it is a cross-sectional study creates a limitation in explaining the cause-effect relationship. Although the number of participants met the sample, it would have been desirable to have more.*

Keywords: *COVID-19, knowledge level, pharmacists, pandemic*

GİRİŞ

Hastane ve toplum eczacıları COVID-19 krizinin kontrol altına alınması ve yönetilmesinde önemli bir rol oynamış ve oynamaya devam etmektedir. Diğer tüm sağlık personeli gibi eczacıların da 2019-nCoV salgınının yayılmasının önlenmesinde önemli bir rol oynadıklarına dair kanıtlar sunulmaktadır [1-5].

Son yıllarda, eczacının profesyonel rollerinin, görevlerinin ve sorumluluklarının kademeli olarak genişlediği bilinmektedir. Başlangıçta, rol “ürün odaklı” ve reçeteli tedavileri dağıtmaktan ibaretse de son on yılda “hizmet odaklı” olmaya doğru yol almıştır. Eczacılar tarafından sunulan hizmetler, hasta danışmanlığı gibi bir dizi farmakolojik olmayan hizmetin sunulmasıyla, kademeli olarak ilaçla sınırlı olmayan alanlara doğru genişlemektedir. Günümüzde eczacı artık sadece ilaç konusunda bir uzman olarak görülmemekte, diğer sağlık uzmanlarıyla iş birliği içinde, önemli bir rol oynayan, ancak meslekten olmayanlar tarafından anlaşılabilir olan, sağlıkla ilgili bir aktörü temsil etmektedir. Bu itibarla, eczacı, toplumun sağlık okuryazarlığını artıran ve özellikle savunmasız ve risk altındaki gruplar olmak üzere vatandaşları eğiten, danışmanlık yapan ve güçlendiren "ayrıcılık bilgi merkezi" olarak hizmet eder [6].

Salgın sırasında, eczacılar ilaç tedariki sağlamaya, gerektiğinde ilaç şirketleri ve üreticilerle yakın temas kurmaya ve yaşlılar, kronik hastalar için ilaçların eve teslim edilmesi gibi hizmetleri sağlamaya devam etmiştir. Eczacılar, alkol bazlı el dezenfektanları ve eldivenler ve maskeler gibi kişisel koruyucu malzemelerin tedariki için ellerinden gelenin en iyisini yapmıştır. “İnfodemik ” olarak bilinen asılsız iddialar, haber ve bilgiler, tüm toplumun pandemiyle mücadele çabalarını tehlikeye atmaktadır. Hasta

danışmanları ve eğitimciler olarak eczacılar, COVID-19 ile ilgili böyle bir yanlış bilgi seline ve söylentilere karşı koyma sorumluluğuna sahiptir. Herhangi bir yanlış iletişim halk arasında kolayca paniğe yol açabilir. Toplum eczaneleri, sağlıkla ilgili endişeleri olanlar veya sadece bilgiye ve güvenilir tavsiyeye ihtiyaç duyanlar için genellikle sağlık sistemi ile ilk temas noktalarıdır [1]. Bu halk sağlığı acil durumu sırasında, toplum eczacıları halk için güvenilir ve erişilebilir bir kaynaktır. Eczacılar hastaların ve halkın, enfeksiyonun bulaşmasını ve daha fazla yayılmasını önlemek için etkili stratejiler (örn. el hijyeni, sosyal mesafe, solunum semptomları varsa evde kalıp izole olma) konusunda eğitilmesinde görevlidir [7]. Eczacılar, kişisel ve çevresel hijyen ve iyi güvenlik uygulamaları hakkında eğitim verebilir, müşterilerine doğru bilgileri iletebilir, kişileri resmi halk sağlığı otoriteleri ve kurumların web sitelerine yönlendirebilirler. Ayrıca aşı tereddütü konusunda sağlık hizmet otoritelerine yardımcı olarak, müşterilerinin aşılınmalarına ikna edebilirler [6]. Teknolojik açıdan bakıldığında, sağlık sektöründe ve diğer sektörlerde COVID-19, dijital tıbbın potansiyel rolünü ve sağlık hizmetlerini iyileştirmek, mesafeleri azaltmak ve insanları yakınlaştırmak, fiziksel teması en aza indirmek ve sağlık hizmeti süreçlerini yavaşlatan bazı bürokrasi biçimlerini kolaylaştırmak için kullanımını ön plana çıkarmıştır. Eczacılar da müşterilerine çevrimiçi video veya telefon görüşmeleri yoluyla hizmet vermeye başlamıştır [6].

Eczacılar, diğer sağlık çalışanları gibi, her zaman profesyonel standartlara uygun olarak halka güvenli hizmet vermekle yükümlüdür. Serbest eczanede enfeksiyon önleme ve kontrol uygulamalarının uygulanması hem personelin hem de müşterilerin tesis içinde kendilerini güvende ve rahat hissetmelerine yardımcı olabilir. Daha da önemlisi, kişisel güvenliğin sağlanması, virüsün insanlar arasında bulaşma risklerinin azaltılması ve eczanedeki eşyaların temasları yoluyla enfeksiyonun yayılmasının önlenmesi açısından kritiktir [7]. Eczacılar da diğer sağlık personeli gibi, salgınla mücadelenin ön safhalarında yer alırlar ve bu durum da onları bu yüksek derecede bulaşıcı hastalık açısından daha yüksek risk altında bırakmaktadır. Eczacılar, kolayca erişilebilen sağlık çalışanlarıdır ve hastalar genellikle bir doktora başvurmadan önce ilaç ve danışmanlık almak için eczacılara gitmektedirler. COVID-19, ayırım gözetmeksizin her yaşta ve sektörden insanı etkileyen oldukça bulaşıcı, küresel bir salgındır. Ama eczacılar bu son derece bulaşıcı hastalıkla mücadelede ön saflarda yer aldığından ve etkilenen hastalarla doğrudan temas halinde olduğundan, genel popülasyona kıyasla hastalığı kapma riski daha yüksektir. Bu nedenle, sağlık görevlilerinin, klinik belirtilerinden teşhisine, önerilen tedavisine ve belirlenmiş önleme stratejilerine kadar hastalığın tüm yönleri hakkında yeterli bilgiye sahip olması son derece önemlidir [3, 8].

Bu çalışmanın amacı, Türkiye’de görev yapan eczacıların COVID-19 hakkında bilgi düzeylerini ölçmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu kesitsel çalışma, Türkiye'deki hastanelerde ve toplum eczanelerinde görev alan eczacıları çalışma kapsamına almıştır. Türk Eczacıları Birliği yayına göre 37.442 eczacı görev yapmaktadır [9]. Raosoft örnekleme programı kullanılarak, %95 güven aralığında eczacıların COVID-19 iyi bilgi düzeyi prevalansı %70 (10) alınarak minimum örneklem sayısı 320 olarak hesaplanmıştır. Yazarları tarafından literatürün kapsamlı bir incelemesinden sonra geliştirilen 16 soruluk doğru-yanlış şeklinde online anket Google formu kullanılarak sosyal medya ve profesyonel platformlar (WhatsApp, Gmail, Instagram, LinkedIn gibi) aracılığı ile eczacılara ulaştırılmıştır. Tüm Türkiye'den anketi tam dolduran 364 eczacı çalışma kapsamında yer almıştır. Araştırmanın verileri Şubat-Nisan 2021 arası toplanmıştır. Online doldurulan anket iki bölümden oluşmuştur. İlk bölüm, katılımcılar hakkında yaş ve cinsiyet gibi genel bilgileri toplamak amaçlanmıştır. İkinci bölümde bilgiyi ölçen 16 önerme yer almaktadır. Her doğru yanıtta 1, yanlış cevaplara 0 puan verilmiştir. Bilgi puanı 11 ve üzeri olanlar iyi bilgi düzeyine sahip olarak sınıflandırılmıştır.

Çalışma protokolü, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (karar no: 2021/01-02). Anketin ilk sayfasında katılımcılara çalışmanın amaçlarını tanıtılmış ve katılımın gönüllü doğasını açıklanmış, ardından katılımcılara çalışmaya katılmak isteyip istemedikleri sorularak reddederlerse anket otomatik olarak sonlandırılmıştır. Ayrıca, anketler anonim gerçekleştirilmiştir. Veri girişi ve analizi için SPSS sürüm 26 (SPSS, Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılmıştır. Tüm kategorik değişkenler frekans ve yüzde olarak sunulmuştur. Bağımsız değişkenler ile bilgi puanlarını karşılaştırmak için bağımsız t testi ve tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. P değeri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Araştırmaya katılan eczacıların özellikleri tablo 1'de görülmektedir, % 41.5 erkek, çoğunluğu toplum eczacısı ve 20 yıl ve üzeri meslek yılına sahiptir. Eczacıların COVID-19 ortalama bilgi puanı 14.5 ± 1.06 (8-16) olarak hesaplanmıştır. Eczacıların bilgi puanı ile cinsiyet, yaş, meslekte deneyim, eğitim durumu ve çalışma yerinin arasında anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir. Tablo 2'de katılımcıların bilgiye ilişkin önermelerine ilişkin yanıtları izlenmektedir. Katılımcıların %99.5'u önermelerin büyük bir kısmını doğru yanıtlayarak iyi düzeyde bilgi düzeyine sahip olduğu belirlenmiştir.

Eczacıların COVID-19 hakkında doğru bilgiye sahip olması ve bu bilgiyi hastalarına ve danışanlarına aktarması önemlidir. Ayrıca bireylerin yüksek bilgi düzeyleri de davranışlarını olumlu etkilemektedir. Bu açıdan eczacıların bilgilerini değerlendiren çalışmalara ihtiyaç vardır. Türkiye'de gerçekleştirilen bu çalışmada eczacıların % 99.5'unun iyi bilgi düzeyine sahip olduğu belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda Eczacıların Mısır'da yaklaşık 2/3'ü, Hindistan'da % 22.7'si, Pakistan'da % 71,5'i, Sudan'da % 51.1'i, Etopya'da % 53,2'si, COVID-19 ile ilgili iyi bilgiye sahip olduğu bildirilmiştir [10- 14]. Çalışmamıza uyumlu olan yüksek iyi bilgi düzeyi sıklığı eczacıların %90'ını aşan sıklıkta COVID-19 ile ilgili yeterli bilgiye sahip olduğu saptanan araştırmalar da mevcuttur [15-18].

Tablo 1. Eczacıların sosyo-demografik özelliklerine göre dağılımı

Cinsiyet	Sayı(n)	Yüzde(%)
Erkek	151	41.5
Kadın	213	58.5
Yaş grup		
20-29	69	19.0
30-39	90	24.7
40-49	87	23.9
50-59	56	15.4
60+	62	17.0
Meslek süre (yıl)		
0-4	61	16.8
5-9	40	11.0
10-14	32	8.8
15-19	52	14.3
20+	179	49.2
En son aldığınız eğitim hangisidir?		
Üniversite	310	85.2
Yüksek Lisans /Doktora	54	14.8
Çalışma durumu		
Eczane	305	83.8
Hastane	59	16.2

Çalışmaya katılan eczacıların büyük çoğunluğu COVID-19'u DSÖ tarafından pandemi olarak ilan edildiğini, virüs olduğunu, damlacık yolu ile bulaştığını, belirtilerini, tanı yöntemini, pnömoniye neden olduğunu, çocuklarda ağır seyirli olma olasılığının daha düşük olduğunu bilmiştir. Komplikasyon, korunma ve tedavi konusundaki önermelere de doğru yanıtın oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın verilerinin pandeminin 1. yılına yakın toplanmasının etkisi olmuştur, eczacılar pandemi sürecinde bilgi ve deneyim kazanmışlardır. Pandeminin farklı süreçlerinde hastalığın etkeni, belirtileri, bulaş yolu, tanı, tedavi ve korunması hakkında eczacıların katılımı ile yapılan çalışmalarda %14.6- %100 olarak değişen sıklıkta farklı yanıtlar belirlenmiştir. Addis Ababa'da eczacıların % 14.6'ı "çocuklar ve ergenleri COVID-19 nedeniyle ciddi hastalık veya ölüm riski yüksek olan hasta grubu" olarak bildirdiği, Ürdün'de tüm katılımcıların hastalığın belirtilerini bildiği anlaşılmıştır [8, 10-22] . COVID-19 bilgi düzeyini etkileyen faktörler incelendiğinde çalışmamızda, homojen bir şekilde bilgi düzeyi yüksek olduğu için bağımsız değişkenler ile bir ilişki saptanmamıştır. Literatürde yaş, meslekte deneyim yılı, yüksek lisans ve doktora eğitime sahip olma ile daha iyi bilgi, deneyim süresi ile bilgi düzeyinin ilişkili olduğu bildirilmekte iken bazı çalışmalarda da bu özellikler ile bilgi düzeyi arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır. [10-22].

Eczacılar, diğer sağlık çalışanları gibi her zaman profesyonel standartlara uygun olarak halka güvenli ve etik bakım sağlamakla yükümlüdürler. Serbest eczanede enfeksiyon önleme ve kontrol önlemlerinin uygulanması hem personelin hem de müşterilerin tesis içinde kendilerini güvende ve rahat

Tablo 2. COVID-19 önermelere verilen yanıtlara göre dağılımları

	Doğru		Yanlış	
	Sayı(n)	Yüzde(%)	Sayı(n)	Yüzde(%)
COVID-19, Dünya Sağlık Örgütü tarafından pandemi olarak ilan edilmiştir.	363	99.7	1	0.3
Coronavirus bir tür bakteridir.	24	6.6	340	93.4
Hastalık esas olarak damlacık yoluyla bulaşmaktadır	353	97.0	11	3.0
Anne sütünden bebeğe bulaşabilir.	94	25.8	270	74.2
Yaygın belirtileri ateş, öksürük ve nefes darlığıdır.	360	98.9	4	1.1
Hastalık hiçbir semptom vermeyebilir.	355	97.5	9	2.5
PCR testi sonucu "negatif" çıkan hastalar kesinlikle hasta değildir.	29	8	335	92
Coronavirus olduğu kanıtlanan her hasta hastaneye yatırılır.	2	0.5	362	99.5
COVID-19 çocuklarda daha ağır seyretmektedir	8	2.2	356	97.8
COVID-19 bir tür zatürredir.	122	33.5	242	66.5
COVID-19 pıhtılaşma problemleri yaparak emboliye neden olabilir.	353	97.0	11	3.0
COVID-19 geçirip iyileşen kişilerin maske takmasına gerek yoktur.	4	1.1	360	98.9
İzolasyondaki hastalar, park ve bahçe gibi ortak alanlarda herkesten uzak şekilde zaman geçirebilirler.	22	6.0	342	94.0
COVID-19 tedavisinde favipiravir öncelikli ilaçtır.	344	94.5	20	5.5
COVID-19 tedavisinde gıda takviyelerinin ilaçlardan daha etkin olduğu bilimsel olarak ortaya konmuştur.	36	9.9	328	90.1
COVID-19 aşı çalışmaları ülkemizde yapılmamaktadır.	26	7.1	338	92.9

hissetmelerine yardımcı olabilir. Toplum eczanelerindeki tüm bu önleyici tedbirler, sadece yerel halkın değil, aynı zamanda dünyanın dört bir yanından turistlerin ziyaret ettiği eczaneler için son derece önemlidir [21, 23]. Çalışmalar, eczacılar için sürekli eğitimin önemini vurgulamaktadır. Genel olarak, acil durumlar sağlık sistemlerini ve sağlık hizmetlerini sunma yeteneklerini baskı altına alır. Şu anda, dünyanın çeşitli bölgelerindeki sağlık hizmetleri, COVID-19 salgını tarafından üretilen artan taleple karşı karşıyadır, eczacının biyolojik felaketler de dahil olmak üzere acil durumlara hazırlıktaki rolü anlaşılmıştır [23]. COVID-19 salgınına karşı ön saflarda yer alan eczacıların COVID-19 salgını sırasındaki rolünü belirlemeye yönelik bir sistematik derlemede eczacıların COVID-19 salgını sırasında önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir [24]. Bilgileri en yüksek doğruluk ve açıklıkla sağlamak için sağlık çalışanlarının doğru ve güvenilir bilgilere sahip olup, güncel olmaları beklenir. Toplumun içinde yer alan ve kolay erişilebilen toplum eczaneleri, danışanlar için değerli bir güvenilir ve kanıt

dayalı bilgi kaynağı olabilir. Toplum eczaneleri, aynı zamanda, bazı ülkelerde tam kapanmaya rağmen halka hizmet etmeye devam eden temel iş yerlerinden biridir. Toplum eczacıları, halk sağlığının hayati bir parçasıdır ve birçok durumda eczanelere erişimin niteliği göz önüne alındığında ilk temas noktasıdır. Eczacılar, düzenli faaliyetlerine ek olarak toplumu; pandeminin doğası, hastalığın semptomları, bulaşma şekli hakkında eğitmek; halk sağlığı kılavuzlarına uygun şekilde önleme ve enfeksiyon kontrol prosedürlerini teşvik etmek için iyi bir donanıma sahiptir. Dünyanın dört bir yanındaki eczacılar şu anda topluluklarına hizmet etmekte ve rutin rollerine ek olarak, genel COVID-19 salgın kontrolüne önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır [25, 26].

Çalışmanın sınırlılıkları şu şekilde sıralanabilir. Kesitsel çalışma olması neden- sonuç ilişkisini açıklamada kısıtlılık yaratmaktadır. Katılımcı sayısının örnekleme karşılamakla birlikte daha fazla olabilmesi arzu edilebilirdi. Çalışma eczacıların pandemi sürecindeki durumlarını vurgulamak açısından önemlidir.

Sonuç olarak, Sağlık hizmetleri iş gücünün üyeleri olarak hastane ve serbest eczanelerde çalışan eczacılar, COVID-19 pandemisine karşı müdahalenin ayrılmaz parçalarıdır. Çalışmanın bulgularına göre, katılımcıların COVID-19'un her bir özel yönü hakkında yüksek düzeyde bilgi sahibi olduğu anlaşılmıştır. Sağlık sisteminde ön saflarda yanıt verenler olarak eczacıların COVID-19 ile ilgili bilgileri önemlidir. Tüm paydaşlar, pandemiye kontrol etmeye yardımcı olacak yeterli malzeme ve hizmet tedarikini sağlamak için çalışmalıdır.

YAZAR KATKILARI

Kavram: *B.N., Ş.K.*; Tasarım: *Ş.K., A.M.*; Denetim: *E.G., E.Ö.*; Kaynaklar: *A.M., B.N.*; Malzemeler: -; Veri toplama ve/veya işleme: -; Analiz ve/veya yorumlama: *A.M.*; Literatür taraması: *A.M., B.N.*; Makalenin yazılması: *E.G., Ş.K., E.Ö.*; Kritik inceleme: *B.N., E.G., E.Ö.*; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

ETİK KURUL ONAYI

Çalışmamız için S.B.Ü İzmir Tepecik Eğitim Araştırma Hastanesi Etik Kurulu'ndan 25.01.2021 tarihinde onay alınmıştır. Karar no:2021/01-02

KAYNAKLAR

1. Ung, C. O. L. (2020). Community pharmacist in public health emergencies: Quick to action against the coronavirus 2019-nCoV outbreak. *Research in Social and Administrative Pharmacy*, 16(4), 583-586. [\[CrossRef\]](#)
2. Hedima, E. W., Adeyemi, M. S., Ikunaiye, N. Y. (2021). Community pharmacists: on the frontline of health service against COVID-19 in LMICs. *Research in Social and Administrative Pharmacy*, 17(1), 1964-1966. [\[CrossRef\]](#)
3. Paudyal, V., Cadogan, C., Fialová, D., Henman, M. C., Hazen, A., Okuyan, B., Stewart, D. (2020). Provision of clinical pharmacy services during the COVID-19 pandemic: Experiences of pharmacists from 16 European countries. *Research in Social and Administrative Pharmacy*, 17(8), 1507-1517. [\[CrossRef\]](#)
4. Ou, H.T., Yang, Y.H.K. (2020). Community pharmacists in Taiwan at the frontline against the novel coronavirus pandemic: gatekeepers for the rationing of personal protective equipment. *Annals of Internal Medicine*, 173(2). 149-150. [\[CrossRef\]](#)
5. Tan, S. L., Zhang, B. K., Xu, P. (2020). Chinese pharmacists' rapid response to the COVID-19 outbreak. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 77(14), 1096-1097. [\[CrossRef\]](#)
6. Bragazzi, N. L., Mansour, M., Bonsignore, A., Ciliberti, R. (2020). The role of hospital and community pharmacists in the management of COVID-19: Towards an expanded definition of the roles, responsibilities, and duties of the pharmacist. *Pharmacy*, 8(3), 140. [\[CrossRef\]](#)
7. Gross, A. E., MacDougall, C. (2020). Roles of the clinical pharmacist during the COVID- 19 pandemic. *Journal of the American College of Clinical Pharmacy*, 3, 564–566. [\[CrossRef\]](#)
8. Yimenu, D. K., Demeke, C. A., Kasahun, A. E., Asrade, S., Mekuria, A. B. (2020). COVID-19: What should health professionals know? Assessment of Knowledge, attitude, and practice of community pharmacists in a developing country. *SAGE Open Medicine*, 8, 2050312120973498. [\[CrossRef\]](#)
9. Fidan, Ü., Türker, M., Durak Albayrak, Ö. (2019). Eczanelerde Ekonomik ve Finansal Durum Araştırması, TEB Yayınları.
10. Ebid, A. H., Ali, A., Mohamed, M., Saqr, A., Elsayy, A., Magdy, S., El-Fass, K. (2021). Knowledge, Practices and Information Sources of Egyptian Community Pharmacists Towards the Novel Coronavirus (COVID-19) during the Peak of the Pandemic. *Journal of Advanced Pharmacy Research*, 5(1), 222-233. [\[CrossRef\]](#)
11. Venkataraman, R., Krishna, H., Varghese, K. K., Sharma, R. (2021). Knowledge and belief towards COVID-19 pandemic among the pharmacy students and professionals. *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 01-08. [\[CrossRef\]](#)
12. Muhammad, K., Saqlain, M., Muhammad, G., Hamdard, A., Naveed, M., Butt, M. H., Karatas, Y. (2021). Knowledge, Attitude, and Practices (KAPs) of Community Pharmacists Regarding COVID-19: A Cross-Sectional Survey in 2 Provinces of Pakistan. *Disaster Medicine and Public Health Preparedness*, 1-9. [\[CrossRef\]](#)
13. Ahmed, N., Saeed, A. (2020). Pharmacists Knowledge and contribution during COVID-19 pandemic in Sudan, 2020. *Authorea*, DOI: 10.22541/au.159526982.21198094. [\[CrossRef\]](#)


14. Tesfaye, Z. T., Yismaw, M. B., Negash, Z., Ayele, A. G. (2020). COVID-19-related knowledge, attitude and practice among hospital and community pharmacists in Addis Ababa, Ethiopia. *Integrated Pharmacy Research & Practice*, 9, 105. [[CrossRef](#)]
15. Hoti, K., Jakupi, A., Hetemi, D., Raka, D., Hughes, J., Desselle, S. (2020). Provision of community pharmacy services during COVID-19 pandemic: A cross sectional study of community pharmacists' experiences with preventative measures and sources of information. *International Journal of Clinical Pharmacy*, 42(4), 1197-1206. [[CrossRef](#)]
16. Kara, E., Demirkan, K., Ünal, S. (2020). Hastane eczacılarının COVID-19 hakkında bilgi ve tutumları. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(3), 242-248. [[CrossRef](#)]
17. Saqlain, M., Munir, M. M., Rehman, S. U., Gulzar, A., Naz, S., Ahmed, Z., Mashhood, M. (2020). Knowledge, attitude, practice and perceived barriers among healthcare workers regarding COVID-19: A cross-sectional survey from Pakistan. *Journal of Hospital Infection*, 105(3), 419-423. [[CrossRef](#)]
18. Hangoma, J. M., Mudenda, S., Mwenechanya, M. M., Kalungia, A. C. (2020). Community pharmacists' knowledge and preparedness to participate in the fight against Coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Zambia. *MedRxiv*. [[CrossRef](#)]
19. Jalil, M. A., Alsous, M. M., Hammour, K. A., Saleh, M. M., Mousa, R., Hammad, E. A. (2020). Role of pharmacists in COVID-19 disease: a Jordanian perspective. *Disaster Medicine and Public Health Preparedness*, 1-7. [[CrossRef](#)]
20. Bahnassi, A. (2020). Knowledge and attitude among Syrian pharmacists towards COVID-19. *Authorea Preprints*. [[CrossRef](#)]
21. Al Mazrouei, N., Ibrahim, R. M., Al Meslamani, A. Z., Abdel-Qader, D. H., Sadeq, A. S., Mohamed Ibrahim, O. (2021). The evolving role of community pharmacists during COVID-19 in the UAE; assessing preparedness and knowledge. *International Journal of Pharmacy Practice*, 29(2), 137-144. [[CrossRef](#)]
22. Shrestha, S., Jha, N., Palaian, S., Shankar, P. R. (2020). Knowledge, awareness and preparedness regarding coronavirus disease 2019 pandemic among community pharmacy practitioners working in Kathmandu, Nepal: A pilot study. *SAGE open medicine*, 8, 2050312120974513. [[CrossRef](#)]
23. Zeenny, R. M., Ramia, E., Akiki, Y., Hallit, S., Salameh, P. (2020). Assessing knowledge, attitude, practice, and preparedness of hospital pharmacists in Lebanon towards COVID-19 pandemic: a cross-sectional study. *Journal of Pharmaceutical Policy and Practice*, 13(1), 1-12. [[CrossRef](#)]
24. Visacri, M. B., Figueiredo, I. V., de Lima, T. M. (2020). Role of pharmacist during the COVID-19 pandemic: A scoping review. *Research in Social and Administrative Pharmacy*, 17(1): 1799–1806. [[CrossRef](#)]
25. Sum, Z. Z., Ow, C. J. (2021). Community pharmacy response to infection control during COVID-19. A cross-sectional survey. *Research in Social and Administrative Pharmacy*, 17(1), 1845-1852. [[CrossRef](#)]
26. Erku, D. A., Belachew, S. A., Abrha, S., Sinnollareddy, M., Thomas, J., Steadman, K. J., Tesfaye, W. H. (2021). When fear and misinformation go viral: Pharmacists' role in deterring medication

misinformation during the 'infodemic' surrounding COVID-19. *Research in Social and Administrative Pharmacy*, 17(1), 1954-1963. [\[CrossRef\]](#)



PHYTOCHEMICAL AND *IN VITRO* PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF *PHLOMIS PUNGENS*

*PHLOMIS PUNGENS'İN FİTOKİMYA VE İN VİTRO FARMAKOLOJİK ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ*

Mehmet Evren OKUR¹ , Ayşe Esra KARADAĞ^{2,3*} , Rengin REİS^{4,5} , Hande SİPAHİ⁴ ,
Rana ARSLAN⁶ , Betül DEMİRCİ⁷ , Fatih DEMİRCİ^{7,8} 

¹University of Health Sciences, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, 34668, Istanbul,
Turkey

²Istanbul Medipol University, School of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 34810, Istanbul,
Turkey

³Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, Department of Pharmacognosy, 26470,
Eskişehir, Turkey

⁴Yeditepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Toxicology, 34755, Istanbul, Turkey

⁵Acibadem Mehmet Ali Aydınlar University, Faculty of Pharmacy, Department of Toxicology, 34684,
Istanbul, Turkey

⁶Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, 26470, Eskişehir, Turkey

⁷Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 26470, Eskişehir, Turkey

⁸Eastern Mediterranean University, Faculty of Pharmacy, Famagusta, 99628, N. Cyprus, Mersin 10,
Turkey

ABSTRACT

Objective: *This study aimed to investigate the in vitro wound healing, anti-inflammatory, antimicrobial and antioxidant activity of Phlomis pungens Willd. extract derived from the aerial parts.*

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Ayşe Esra Karadağ
e-mail / e-posta: aeguler@medipol.edu.tr, **Phone / Tel.:** +902164189616

Material and Method: The phytochemical analysis was performed using GC-MS in order to identify the volatile components of the bioactive Hex extract. The wound healing activity of *P. pungens* extract was evaluated based on *in vitro* antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and, scratch activity was studied. In addition, the *in vitro* cytotoxicity of the extract was also evaluated.

Result and Discussion: *P. pungens* methanol extract depicted a 5-LOX inhibitory activity at 78.2 µg/mL (IC_{50}), while the antioxidant activity by DPPH radical provided an $IC_{50}=2.41$ mg/mL, and the ABTS radical showed $IC_{50}=3.32$ mg/mL, respectively. The extract showed dose-dependently anti-inflammatory activity while L-NAME and *P. pungens* methanol extract significantly decreased LPS stimulated PGE₂ production. According to the scratch assay results, all treatments led to an increase in cell migration rate with a dose-dependent effect. Our findings suggested that *P. pungens* methanol extract may have a role in wound healing according to the scratch test, and it is thought that its antioxidant and anti-inflammatory activity also contributed. Further evaluations are ongoing to confirm the *in vitro* activity under *in vivo* conditions.

Keywords: Cell culture, fibroblast, inflammation, Lamiaceae, macrophage

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada, *Phlomis pungens* Willd. topraküstü kısımlarından elde edilen ekstraktın *in vitro* yara iyileşmesi, antiinflamatuar, antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Biyoaktif heksan ekstresinin uçucu bileşenlerini belirlemek için fitokimyasal analiz GC-MS kullanılarak yapılmıştır. *P. pungens* ekstresinin yara iyileştirme aktivitesi, *in vitro* antimikrobiyal, antioksidan, antiinflamatuar etkinlikleri değerlendirilmiş ve ek olarak ekstrenin *in vitro* sitotoksitesisi de değerlendirilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: *P. pungens* metanol ekstresi, 78,2 µg/mL'de (IC_{50}) 5-LOX inhibe edici aktivite gösterirken, DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesi $IC_{50}=2.41$ mg/mL ve ABTS $IC_{50}=3.32$ mg/mL olarak bulunmuştur. Ekstre, doza bağlı olarak anti-inflamatuar aktivite gösterirken, L-NAME ve *P. pungens* metanol ekstresi, LPS ile uyarılan PGE₂ üretimini önemli ölçüde azaltmıştır. Strach metodu sonuçlarına göre doza bağlı etki ile hücre göç hızında bir artış gözlemlenmiştir. Bulgularımız, starch testine göre *P. pungens* metanol ekstresinin yara iyileşmesinde rol oynayabileceğini ve antioksidan ve antiinflamatuar aktivitesinin de katkıda bulunduğu düşündürmüştür. *In vivo* koşullar altında *in vitro* aktiviteyi doğrulamak için başka değerlendirmeler devam etmektedir.

Anahtar kelimeler: Enflamasyon, fibroblast, hücre kültürü, Lamiaceae, makrofaj

INTRODUCTION

The *Phlomis* species with their preparations are known as wounds healing agents according to folk medicine information [1]. Furthermore, previous studies revealed that *Phlomis pungens* Willd. which belongs to Lamiaceae family possess a wide spectrum of pharmacological activities [2-3].

As it is well known, generally, wound repairing is progressed through four overlapping stages: hemostasis, inflammation, proliferation, and maturation [1,2]. Inflammation is a complex biological response of body tissues to harmful stimuli, such as pathogens, damaged cells, free radicals, or irritants [3,4]. Prolonged inflammation, known as chronic inflammation leads to simultaneous destruction and healing of the tissue derived from the inflammatory process [3] while and increased oxidative stress can hamper further the wound process. Treatments with natural products such as plant extracts can accelerate the wound healing process, given that they can eliminate microbial contamination and wound inflammation, due to their favorable properties [5].

The objective of the present study was to assess and demonstrate the pharmacological activities of *P. pungens* (PP) extract focusing on its wound healing properties. Anti-inflammatory activity was assessed by *in vitro* methods; lipoxigenase enzyme inhibition and lipopolysaccharide-induced

Prostaglandin E2 and nitrite levels in RAW 264.7 cells. The wound healing activity of PP was also assessed by *in vitro* scratch assay.

MATERIAL AND METHOD

Extract Preparation

The aerial parts of *Phlomis pungens* Wild. (PP) were manually harvested at 2016 from Arguvan region (Malatya, Turkey). Faculty of Pharmacy Herbarium (Istanbul University) was contained the voucher specimen (ISTE 115025) for aerial parts. The dried-samples of PP were extracted by maceration with methanol, followed by a liquid-liquid fractionation using *n*-hexane (Hex), dichloromethane (CH₂Cl₂), and ethyl acetate (EtOAc), respectively.

Phytochemical Analyses

GC/MS analysis of PP Hex extract was carried out with an Agilent 5975 GC-MSD system. Innowax FSC was used with helium as carrier gas. The GC analysis was performed with an Agilent 6890N GC system. Relative percentage amounts of the separated compounds were calculated from FID chromatograms as mentioned previous studies [6].

Identification of the essential oil components was carried out by comparison of their relative retention times with those of authentic samples or by comparison of their relative retention index (RRI) to a series of *n*-alkanes. The components of essential oils were identified by comparison of their mass spectra with those in the Baser Library of Essential Oil Constituents, Wiley GC/MS Library, MassFinder Library [6].

In vitro Antioxidant Assays

DPPH Radical Scavenging Assay

Antioxidant capacity of PP methanol extract was examined with DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) [7]. Optical density was measured spectrophotometrically at 517 nm. The analysis was compared with ascorbic acid as standard reference, according to our previous work [8].

ABTS Radical Scavenging Assay

The antioxidant effect of the extracts were detected using ABTS (2, 2-azino-bis-3 ethyl benzothiazoline-6-sulphonic acid) radical radical cations decolourisation assay according to protocol of Re et al. [9]. Assays were conducted comparatively using standard reference substances such Trolox, as per in our previous work [8].

Total Phenolic Content

The total phenolic content of PP methanol extract was determined using the Folin-Ciocalteu method. The optical density was read at 765 nm. A calibration curve ($R^2 = 0.9816$) was used to determine the total phenolics compounds [10].

Antimicrobial Studies

The antimicrobial properties of PP methanol extract was found out using the broth microdilution test that was conducted to the method of Clinical and Laboratory Standards Institute. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* NRLL B-3008, and *Candida albicans* ATCC 64548 strains were investigated in this work. Mueller Hinton Broth was used for antibacterial assays whilst RPMI broth was used for antifungal assay.

Lipoxygenase (LOX) Inhibition Assay

A modified spectrophotometric method which was formed by Baylac and Recine, was used to determine the 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibition potential of the PP methanol, EtOAc, CH_2Cl_2 and Hex extracts [11]. Herein, a nordihydroguaiaretic acid (NDGA), a known inhibitor of soybean lipoxygenase, was used as a reference standard drug.

Cytotoxicity

Cell Culture

The L929 mouse fibroblast and RAW 264.7 murine macrophage cell lines were cultured in DMEM (10% FBS, v/v) and supplemented with 1% (v/v) penicillin–streptomycin. Cells were incubated at 37°C and 5% CO_2 and were passaged out every 2–3 days.

Cytotoxicity by MTT Assay

MTT [3-[4,5-dimethylazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] assay was performed to assess the cytotoxicity profile of PP on RAW264.7 and L929. Concisely, RAW264.7 and L929 cells were plated and incubated in a 5% CO_2 atmosphere at 37°C for 24h to form a confluent layer. Cells were treated with various concentrations (0.125-1 mg/mL) of PP freshly diluted with cell culture medium. After 1 day incubation 0.5 mg/mL MTT was applied to per well and continued with 2h incubation at 37°C. A UV-spectrophotometric plate reader was used to measure the absorbance of the blue formazan at 570 nm. (Thermo, Finland) [12].

Anti-inflammatory Activity

Griess assay was used to detect the anti-inflammatory potential of PP methanol extract on RAW 264.7 cell through stabile metabolite of NO, nitrite level [12]. After 24h incubation, RAW 264.7 cells

were pre-treated with various concentrations of PP for 2h followed by stimulation for 22h with 1 mg/mL lipopolysaccharide (LPS extracted from *E. coli* 0111:B4) at 37°C in an incubator with 5% CO₂.

Nitrate level was estimated in cell supernatants using Griess reagents in each well of a 96-well plate. Absorbance was measured at a wavelength of 540 nm in a microplate reader (Multiskan Ascent, Finland). NO production was measured as the concentration of nitrite by comparing against a standard curve generated using NaNO₂. 0.1 mg/mL L-NAME (L-NG-Nitro arginine methyl ester), a non-selective nitric oxide synthase inhibitor, was served as a control.

Anti-inflammatory activity of PP methanol extract was also supported with Prostaglandin E₂. The anti-inflammatory effect of the PP methanol extract was also verified using the Prostaglandin E₂ ELISA Kit (Abcam, UK) and 100 µL of cell supernatants treated with LPS and compounds, as instructed by the manufacturer.

***In Vitro* Wound Healing Activity by Scratch Assay**

The wound healing properties of the PP extract were assessed by scratch assay *in vitro* by assessing the migration rate of the L929 mice fibroblast cell line within 24h. Briefly, cells were seeded in 24-well cell culture plate. After the cells had nearly formed a confluent cell monolayer, a linear wound was generated in the monolayer using a sterile 100 µL plastic pipette tip. Any cellular debris was removed by washing the wells with phosphate buffer saline (PBS).

Different concentrations (0.125-0.5 mg/mL) of PP extracts were administered to each scratched well and incubated at 37°C and 5% CO₂ in humidified atmosphere.

Directly after generating the scratch (0h) and after 8, and 24 h (end point time) microscopic images of the same area of the respective scratch were taken (AxioCam, Germany).

Statistical Analysis

Statistical analyses were evaluated with GraphPad Prism 7.0 program (California, USA). Values for p<0.05 were considered statistically significant. T-test was used to compare the significant differences between groups.

RESULT AND DISCUSSION

Hex extract yield (17.9 g; 41.7%) was highest over total methanol extract (43 g). The yields of EtOAc and CH₂Cl₂ extracts were 16.5% and 3.7%, respectively. The Hex fraction of *Phlomis pungens* Willd. (PP) was examined by GC-MS and hexadecanoic acid (38.7%) was determined as a major constituent. Other compounds found in the extract were benzophenone (19.3%), methyl decanoate (15.6%), and methyl pentadecanoate (13.6%), respectively.

In further, the PP methanol extract displayed moderate *in vitro* antioxidant capacity compared to Trolox (0.015 mg/mL) and ascorbic acid (0.002 mg/mL), against ABTS ($IC_{50}=2.32$ mg/mL) and DPPH ($IC_{50}=1.41$ mg/mL) free radicals. The entire phenolic constituents of PP methanol extract was 2967 mg of gallic acid/100g extract.

Moreover, the antimicrobial activity of the different extracts of PP was against tested microorganisms. Table 1 shows the antimicrobial activity of PP extracts, and the reference compounds versus the tested microorganisms. The PP methanol and Hex extracts showed antifungal activity against the *C. albicans* (250 μ g/mL). *C. albicans* was more responsive to the PP, while the tested bacteria were resistant.

IC_{50} values of lipoxygenase inhibitory activities of methanol, EtOAc, CH_2Cl_2 and Hex extracts of PP were 27 ± 2.8 , 77.4 ± 1.5 , 32 ± 0.7 , 26.1 ± 1.2 μ g/mL, respectively as compared to NDGA (3.2 ± 0.9 μ g/mL).

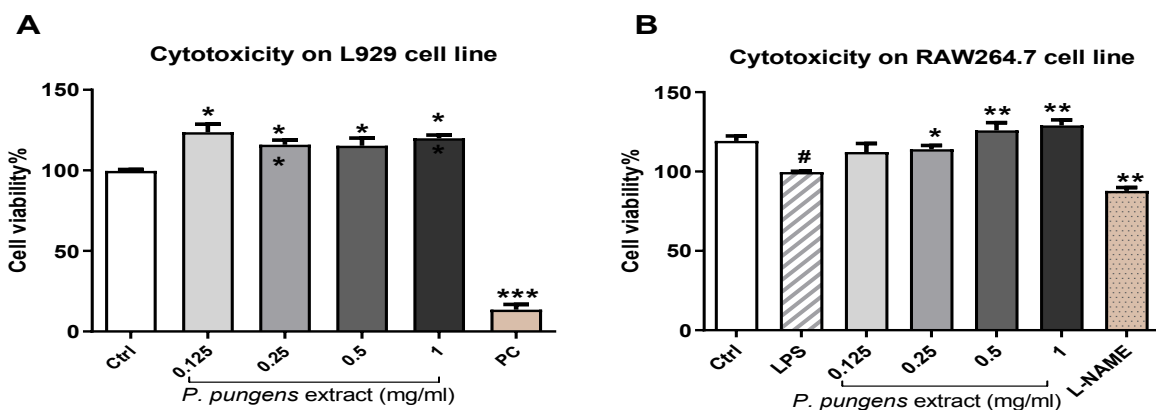
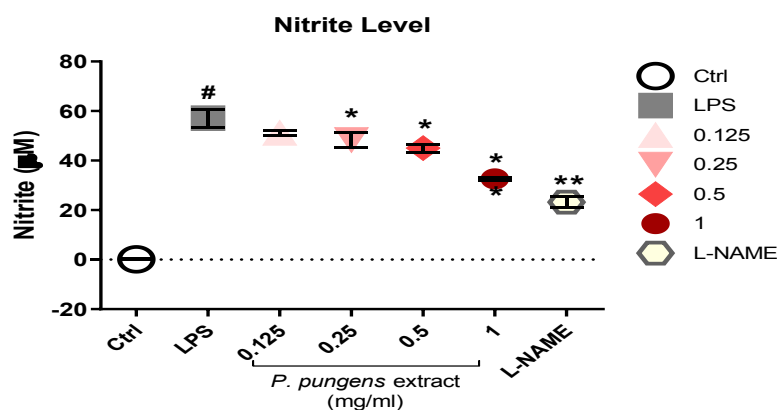
The cytotoxic effects of the PP methanol extract on L929 and RAW264.7 cell lines were demonstrated in Figure 1 as cell viability % compared to control. According to MTT results PP did not exhibit cytotoxicity on L929 and RAW264.7 cell lines at concentrations between 0.125-1 mg/mL (Fig. 1A). Furthermore, a notable increased proliferation of RAW264.7 cells was observed with PP in a dose dependent manner (Fig. 1B).

In vitro anti-inflammatory capacity of PP was assessed with nitrite level and several concentrations (between 0.125-1 mg/mL) of the extract were tested based on MTT results which showed no cytotoxicity for these doses. As seen in Figure 2, PP showed dose-dependently anti-inflammatory activity. In addition, 0.25, 0.5 and 1 mg/mL concentrations of the extract have showed a significant reduction in LPS-induced nitrite production in RAW 264.7 cells. Moreover, nitrite inhibition % of related concentrations were found as 18.68%, 21.33%, and 40.16 % compared to LPS, respectively. The analgesic activity of nitrite reducing doses of PP (0.25-1 mg/mL) was determined by the PGE_2 level. As seen in Figure 3, L-NAME (0.1 mg/mL) and PP (0.25-1 mg/mL) significantly decreased LPS stimulated PGE_2 production. The highest PGE_2 inhibition was seen with 0.125 mg/mL of the extract ($p<0.05$).

The wound healing properties of the PP were assessed through *in vitro* scratch assay. The cell proliferation and migration rate of groups were recorded at time 0, 8, and 24 h. In Figure 4, microscopical scratch images of groups treated with different concentrations of PP extract at time 0, 8, and 24 h were given. According to the results, all treatments have led to an increase in cell migration rate in a dose-dependent manner in comparison to the control. In Figure 5, the relative wound healing activity of each group was given. As it was expected, the ration of *in vitro* wound healing is interestingly high since wound healing was analogous with the dose of the extract and above 90%.

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial activity in various extracts of *P. pungens* ($\mu\text{g/mL}$)

	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
Methanol	>1000	1000	>1000	>1000	250
Ethyl acetate	500	1000	>1000	1000	>1000
Dichloromethane	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
n-hexane	500	1000	1000	1000	250
Tetracycline	0.25	>16	>16	16	
Ketoconazole					0.25

**Figure 1.** Cytotoxicity profile of PP on L929 (A) and RAW264.7 (B) cell lines by MTT assay. Data were expressed as mean \pm SD compared to control. (A) Statistically significant difference; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control (B) All groups except Ctrl were treated with LPS. Statistically significant difference: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. LPS and the significant difference between Ctrl and LPS were defined with # $p < 0.05$. Ctrl: Group treated with DMEM; L-NAME: L-N^G-Nitro arginine methyl ester (0.1 mg/mL); PC: 20% (v/v) DMSO.**Figure 2.** Inhibition of nitrite production by PP in LPS-induced RAW264.7 cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; significant difference from LPS and the significant difference between Ctrl and LPS were defined with # $p < 0.01$. Data were expressed as mean \pm SD compared to LPS. Ctrl: Group treated with DMEM; L-NAME: L-N^G-Nitro arginine methyl ester (0.1 mg/mL).

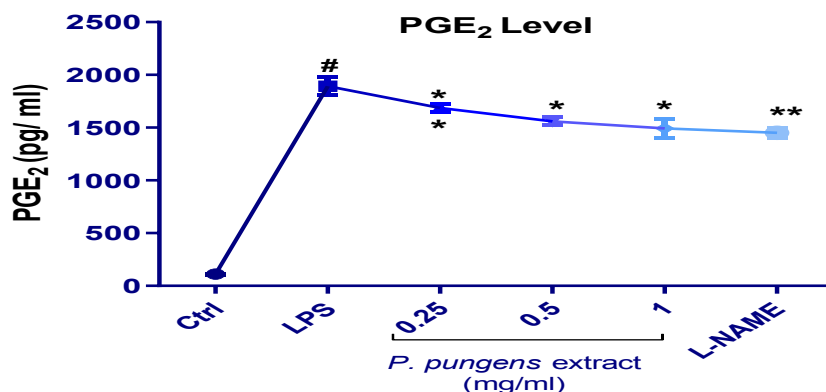


Figure 3. Inhibition of LPS-induced PGE₂ production by PP

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; significant difference from LPS and the significant difference between Ctrl and LPS were defined with # $p < 0.001$. The outcomes were illustrated as mean \pm SD compared to LPS. Ctrl: Group treated with DMEM; L-NAME: L-NG-Nitro arginine methyl ester (0.1 mg/mL).

The present study revealed the antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and wound healing activity of *Phlomis pungens* Willd. (PP) methanol extract.

GC-MS analysis proved the presence of hexadecanoic acid, which is a saturated fatty acid known for various pharmacological activities, such as anti-inflammatory [13] by downregulating pro-inflammatory cytokines. Hence, hexadecanoic acid can be considered as the major component responsible for anti-inflammatory activity of PP as it was quoted from previous studies [14]. However, although, in the past works, the antioxidant activity evaluation was performed with PP methanol extract, the derived results in this study differed from the previous one [15,16]. Consequently, it can be said that the parameters such as flora and time of harvest where the plant grows can change the secondary metabolites of the plant and therefore its activity.

The antimicrobial studies reveal that the PP did not show any remarkable antibacterial effect but depicted an interesting antifungal property. *C. albicans* have been found in surgical wounds which are prone to become chronic; considerably, the extract can be also applied for fungi contaminated wounds.

It is well known that lipid mediators originated by 5-LOX metabolism can activate both pro- and anti-inflammatory pathways. However, their role during wound healing has not fully understood but seems to be important in wound healing [17]. Several experiments have shown that the absence of 5-lipoxygenase triggers rapid dermal wound closing. [17,18]. In this work, the methanol and Hex extracts showed moderate inhibitory activity to 5-LOX which however is in the acceptable limits.

Cell viability which can be evaluated by MTT assay is among the most important studies for wound healing applications. It is well reported that wound systems which are toxic to microbial cells could potentially be toxic to the skin cells. This cytotoxicity could affect the cells in various pathways such as stopping their growth, divide and inducing their necrosis due to cell lysis. Considerably, these facts can reduce the viability, proliferation, and mobility of the cells and further delay the wound healing

activity [19]. As it was expected, the developed extract did not depict any signs of cytotoxicity which is very promising.

The raised level of PGE₂ is a sign of progression of inflammation in several cell types and variant inflammatory disorders. Furthermore, decreased level of PGs in fetal skin tissue might display a less severe inflammatory response, which results in little scar formation after wound healing [20]. In this study, PP presented dose-dependently anti-inflammatory activity which is very important for wound healing applications. Finally, the inhibition of prostaglandin production has been associated with reduced pain; hence, herein the PP showed inhibition of LPS-induced PGE₂ production which can potentially leads to reduced pain and improved anti-inflammatory activity.

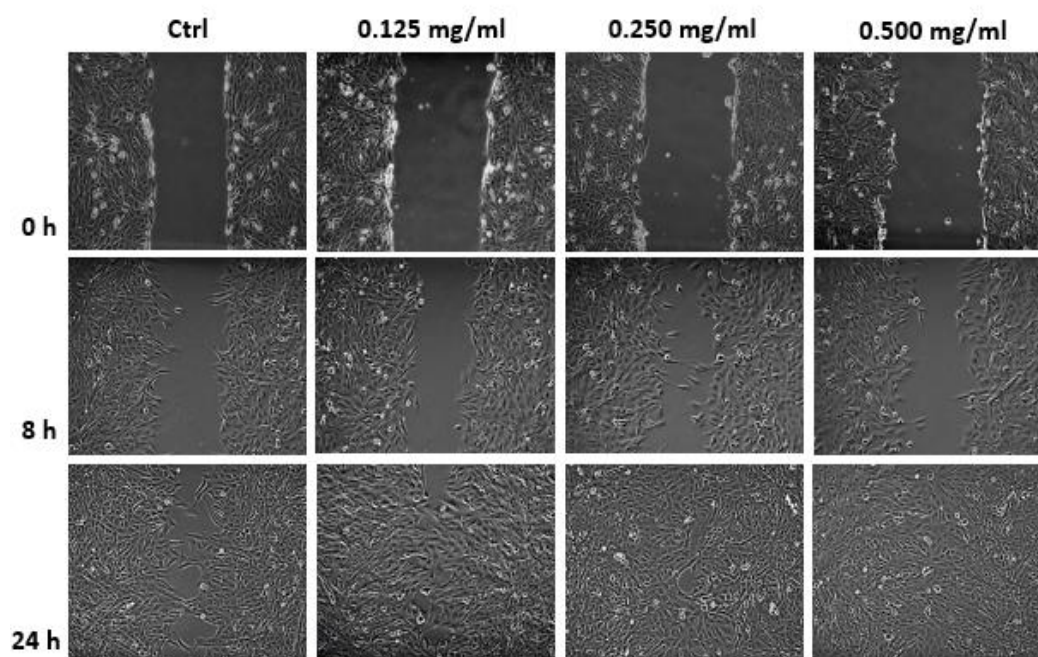


Figure 4. Microscopical figures of *in vitro* wound healing activity of *P. pungens* extract on L929 cell line

Scratches formed and images were taken with a microscope at 10 magnification at 0, 8, and 24 h. Ctrl: Control group treated with medium.

Fibroblasts perform a crucial function by proliferating, spreading to the lesion site, and stimulating the formation of new extracellular matrix in the initial stages of wound healing [21]. Therefore, fibroblast cell lines such as L929 have been widely employed to assess wound healing activity *in vitro* [22]. The initial steps of wound healing are activation, proliferation, and migration of fibroblasts during which multiple cell types and other micro environmental factors seems to be involved. Scratch assay has been widely applied to study *in vitro* the wound healing applicability of naturally derived plants; it was found that wound contraction was desirable when the extract applied to L929 fibroblast cell lines.

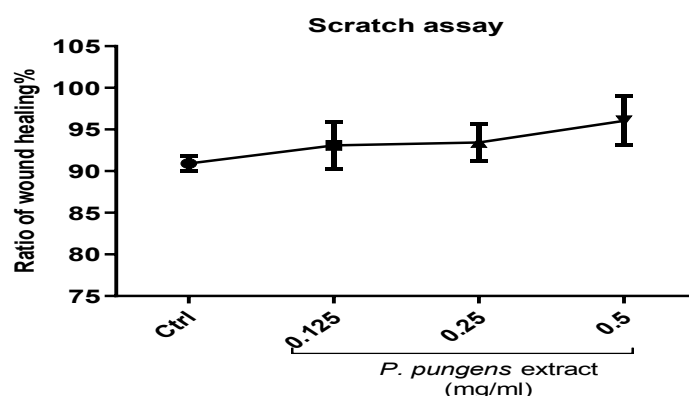


Figure 5. Wound healing effect of *P. pungens* extract on L929 cell

Relative wound healing according to the closed gap between scratch margins within 24 h for each group. Ctrl: Control group treated with medium.

Present investigations concluded that PP demonstrated *in vitro* antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidant properties. According to our results, it could be suggested that PP contributes greatly to *in vitro* wound healing process owing to its antioxidant and anti-inflammatory activity. Due to the wound repairing (*in vitro*) behavior of the *P. pungens* extract further investigation on animal models or humans could assure the possible application of the extract for wound healing. PP extract may have a role in wound healing with the scratch test, and it is thought that its antioxidant and anti-inflammatory activity also contributes to this effect. It is thought that this study related to the effects of PP extract will lead to new studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Prof. Dr. Şükran Kültür for identifying confirmation and Muhammet Karadağ for harvesting the plant material. This research project was supported by Anadolu University Scientific Research Projects (Project No:1807S259).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception: M.E.O., A.E.K., F.D.; Design: M.E.O., A.E.K., F.D.; Supervision: F.D.; Resources: F.D., B.D.; Materials: A.E.K., H.S., R.R.; Data collection and/or processing: A.E.K., R.R., H.S.; Analysis and/or interpretation: B.D., R.R., A.E.K.; Literature search: A.E.K., M.E.O.; Writing manuscript: M.E.O., A.E.K.; Critical review: F.D., B.D.; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

The authors declare that the ethics committee approval is not required for this study.

REFERENCES

1. Tanrıverdi, S.T., Suat, B., Azizoglu, E., Köse, F.A., Özer, Ö. (2018). In-vitro evaluation of dexpanthenol-loaded nanofiber mats for wound healing. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 17(3), 387–394. [\[CrossRef\]](#)
2. Chingwaru, C., Bagar, T., Maroyi, A., Kapewangolo, P.T., Chingwaru, W. (2019). Wound healing potential of selected Southern African medicinal plants: A review. *Journal of Herbal Medicine*, 17–18, 100263. [\[CrossRef\]](#)
3. Muthachan, T., Tewtrakul, S. (2019). Anti-inflammatory and wound healing effects of gel containing *Kaempferia marginata* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 240, 111964. [\[CrossRef\]](#)
4. Ghuman, S., Ncube, B., Finnie, J.F., McGaw, L.J., Mfotie Njoya, E., Coopoosamy, R.M., Van Staden, J. (2019). Antioxidant, anti-inflammatory and wound healing properties of medicinal plant extracts used to treat wounds and dermatological disorders. *South African Journal of Botany*, 126, 232–240. [\[CrossRef\]](#)
5. Okur, M.E., Karantas, I.D., Şenyiğit, Z., Okur, N.Ü., Siafaka, P.I. (2020). Recent trends on wound management; new therapeutic choices based on polymeric carriers. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(6), 661-684. [\[CrossRef\]](#)
6. Demirci, B., Baser, K.H.C., Dadandi, M.Y. (2006). Composition of the Essential Oils of *Phlomis rigida* Labill. and *P. samia* L. *Journal of Essential Oil Research*, 18(3), 328–331. [\[CrossRef\]](#)
7. Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200. [\[CrossRef\]](#)
8. Okur, M.E., Ayla, Ş., Çiçek Polat, D., Günal, M.Y., Yoltaş, A., Biçeroğlu, Ö. (2018). Novel insight into wound healing properties of methanol extract of *Capparis ovata* Desf. var. *palaestina* Zohary fruits. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(10), 1401–1413. [\[CrossRef\]](#)
9. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231–1237. [\[CrossRef\]](#)
10. Spanos, G.A., Wrolstad, R.E. (1990). Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson Seedless grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(7), 1565–1571. [\[CrossRef\]](#)
11. Baylac, S., Racine, P. (2003). Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragment extracts. *International Journal of Aromatherapy*, 13(2-3), 138–142. [\[CrossRef\]](#)
12. Reis, R., Sipahi, H., Zeybekoğlu, G., Çelik, N., Kırmızıbekmez, H., Kaklıkkaya, N., Aydın, A. (2018). Hydroxytyrosol: The phytochemical responsible for bioactivity of traditionally used Olive

- Pits. *Euroasian Journal of Hepatogastroenterology*, 8(2), 126–132. [\[CrossRef\]](#)
13. Aparna, V., Dileep, K.V., Mandal, P.K., Karthe, P., Sadasivan, C., Haridas, M. (2012). Anti-Inflammatory Property of n-Hexadecanoic Acid: Structural Evidence and Kinetic Assessment. *Chemical Biology&Drug Design*, 80(3), 434–439. [\[CrossRef\]](#)
 14. Okur, M.E., Karadağ, A.E., Üstündağ Okur, N., Özhan, Y., Sipahi, H., Ayla, Ş., Daylan, B., Demirci, B., Demirci, F. (2020). In Vivo Wound Healing and In Vitro Anti-Inflammatory Activity Evaluation of Phlomis russeliana Extract Gel Formulations. *Molecules*, 25(11), 2695. [\[CrossRef\]](#)
 15. Sarikurkcu, C., Uren, M. C., Tepe, B., Cengiz, M., Kocak, M.S. (2014). Phenolic content, enzyme inhibitory and antioxidative activity potentials of Phlomis nissolii and P. pungens var. pungens. *Industrial Crops and Products*, 62, 333–340. [\[CrossRef\]](#)
 16. Taskin, T., Bulut, G., Hazar, A.N. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory activities of Phlomis pungens and Coridothymus capitatus. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 22(1), 80–85. [\[CrossRef\]](#)
 17. Brogliato, A.R., Moor, A.N., Kesi, S.L., Guilherme, R.F., Georgii, J.L., Peters-Golden, M., Canetti, C., Gould, L.J., Benjamim, C.F. (2014). Critical Role of 5-Lipoxygenase and Heme Oxygenase-1 in Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(5), 1436–1445. [\[CrossRef\]](#)
 18. Guimarães, F.R., Sales-Campos, H., Nardini, V., da Costa, T.A., Fonseca, M.T.C., Júnior, V.R., Sorgi, C.A., da Silva, J.S., Chica, J.E.L., Faccioli, L.H. (2018). The inhibition of 5-Lipoxygenase (5-LO) products leukotriene B4 (LTB 4) and cysteinyl leukotrienes (cysLTs) modulates the inflammatory response and improves cutaneous wound healing. *Clinical Immunology*, 190, 74–83. [\[CrossRef\]](#)
 19. Chen, R., Salisbury, A., Percival, S.L. (2019). In vitro cellular viability studies on a concentrated surfactant- based wound dressing. *International Wound Journal*, 16(3), 703–712. [\[CrossRef\]](#)
 20. Su, W.H., Cheng, M.H., Lee, W.L., Tsou, T.S., Chang, W.H., Chen, C.S., Wang, P.H. (2010). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs for Wounds: Pain Relief or Excessive Scar Formation? *Mediators of Inflammation*, 2010, 413238. [\[CrossRef\]](#)
 21. Li, W., Fan, J., Chen, M., Guan, S., Sawcer, D., Bokoch, G.M., Woodley, D.T. (2004). Mechanism of Human Dermal Fibroblast Migration Driven by Type I Collagen and Platelet-derived Growth Factor-BB. *Molecular Biology of the Cell*, 15(1), 294–309. [\[CrossRef\]](#)
 22. Bolla, S.R., Mohammed Al-Subaie, A., Yousuf Al-Jindan, R., Papayya Balakrishna, J., Kanchi Ravi, P., Veeraraghavan, V.P., Arumugam Pillai, A., Gollapalli, S.S.R., Palpath Joseph, J., Surapaneni, K.M. (2019). In vitro wound healing potency of methanolic leaf extract of Aristolochia saccata is possibly mediated by its stimulatory effect on collagen-1 expression. *Heliyon*, 5(5), e01648. [\[CrossRef\]](#)



MOLECULAR DOCKING STUDIES OF COX INHIBITORS ON WILD-TYPE RAS

COX İNHİBİTÖRLERİNİN YABANI-TİP RAS ENZİMİ ÜZERİNDE MOLEKÜLER DOKİNG ÇALIŞMALARI

Dilan KONYAR^{1*} , Hayati OKUR¹ , Zehra ARSLAN¹ 

¹Dicle University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, 21280, Diyarbakir, Turkey

ABSTRACT

Objective: In addition to its role in the formation mechanism of inflammation, the binding potential of COX inhibitors, which can inhibit tumorigenesis by induce apoptosis, has been explored by molecular docking studies on wild-type RAS enzyme.

Material and Method: KRAS enzyme (PDB ID: 4OBE), which consists is obtained by the x-ray crystallization method, was chosed considering the resolution. The 2D structures of ligand molecules were drawn in the ChemDraw 19.1. The MOE 2020 program was used to form the docking studies.

Result and Discussion: As a result of docking studies, it has been understood that the presence of aromatic structures in 3a and 3b ligand molecules is critical for ligand-receptor interaction. it has been understood that there must be a certain distance between the carbonyl group and the nonpolar part of the molecule for the molecule to bind to the receptor site with a high affinity. In the following stages, more effective anticancer drug molecules can be obtained by design molecules with an appropriate diameter and length, having functional groups containing the suitable electron donor or acceptor.

Keywords: RAS, COX inhibitors, docking, MOE, binding affinity

ÖZ

Amaç: İnflamasyon oluşum mekanizmasındaki rolünün yanı sıra apoptoz oluşumunu tetikleyerek tümörögenesisi inhibe edebilen COX inhibitörlerinin yabani-tip RAS enzimi üzerinde moleküler doking çalışmaları ile bağlanma potansiyelleri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: X-ışını kristalizasyon yöntemi ile elde edilen KRAS enzimi (PDB kodu: 4OBE) çözünürlük dikkate alınarak seçilmiştir. Ligand moleküllerinin 2 boyutlu yapıları ChemDraw 19.1'de çizilmiştir. Doking çalışmaları için MOE 2020 programı kullanılmıştır.

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Dilan Konyar
e-mail / e-posta: konyardilan@gmail.com, **Phone / Tel.:** +905069257097

Sonuç ve Tartışma: *Docking çalışmaları sonucunda 3a ve 3b ligand moleküllerinde aromatik yapıların varlığının ligand-reseptör etkileşimi için kritik olduğu anlaşılmıştır. Molekülün reseptör bölgesine yüksek afinite ile bağlanabilmesi için karbonil grubu ile molekülün polar olmayan kısmı arasında belirli bir mesafe olması gerektiği anlaşılmıştır. İlerleyen aşamalarda uygun elektron verici veya alıcı içeren fonksiyonel gruplara sahip uygun çap ve uzunlukta moleküller tasarlanarak daha etkili antikanser ilaç molekülleri elde edilebilir.*

Anahtar kelimeler: *RAS, COX inhibitors, docking, MOE, bağlanma afinitesi*

INTRODUCTION

KRAS, NRAS, and HRAS are small GTPase proteins that attitude as cycling between inactive GDP-bound and active GTP-bound forms, transmitting signals from membrane bound receptors and expressed in all humans [1]. When Ras proteins are activated, “switch on” of downstream effectors that turn on genes, which are concerned in essential cellular processes such as cell growth, differentiation, and survival. It was identified as a retroviral oncogene by Harvey and Kirsten in the 1960s when sarcomas were excited in rodents from a murine leukemogenic virus preparation. Therefore, Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog as it is named [2, 3].

There are four different RAS proteins (HRAS, NRAS, KRAS4A and KRAS4B) encoded by three human Ras genes (HRAS, NRAS and KRAS) [4]. Because of their crucial role in signaling, mutation of the RAS gene family is implicated in human cancers [5]. These mutations cause sequential signal activation, thereby leading to the development of various cancers such as pancreatic, colorectal and lung malignancies [4]. Mutations in codons 12, 13 and 61 of Ras proteins are known to be associated with cancer [6]. Mutations of RAS proteins occur in more than 30% of human cancers [7]. Mutational profiles in different cancer types differ among of RAS gene isoforms [6].

For example, there is the most commonly mutation of KRAS with 86 % possibility, and it occurs mostly in pancreatic ductal, colorectal, lung, ovarian and endometrial carcinoma. On the other hand, while the isoform NRAS mutations were occurred in cutaneous melanoma, hematopoietic malignancies, and colorectal cancer at amino acid 61. HRAS is the isoform mutated from amino acids 12, 13 and 61 in bladder and cervical cancers [7, 8].

For more than three decades, the importance of the numerous roles of RAS proteins in essential cellular processes has been identified. For this reason, inhibitor drug development studies are realized against these oncogenes. However, these studies have been quite challenging as the inhibition of wild-type RAS could be lethal [9].

Inflammation, which is the necessary defense mechanism to protection cellular homeostasis, is also a protective biological response of living mammalian tissue to harmful stimuli [10].

The inflammatory process is classified as acute or chronic. While acute inflammation takes minutes, a few hours, or several days to be protective, chronic inflammation results from uncontrolled acute inflammation that is amplified by long-term adverse stimuli such as an ongoing disease or

permanent cellular damage, ultimately leading to damaged tissues [10].

It mainly causes diseases including as cancer, asthma, rheumatoid arthritis, neurodegenerative disease, metabolic and cardiovascular disorders [11-17].

NSAIDs are known to have anticancer effects. NSAIDs act by inhibiting the COX-associated tumorigenesis mechanism, thereby making hazardous exposures less toxic. This mechanism is extremely related to the aero-digestive organs (i.e. lung and colon) submitted to a wide range of exogenous chemicals (i.e. xenobiotics) [18,19].

Increased the production of angiogenic growth factor [vascular endothelial growth factor (VGEF), basic fibroblast growth factor (bFGF) and transforming growth factor-beta (TGF-)] has been seen in cancer cells with overexpression of COX-2 [20]. These formations could be prevented by selective COX2 inhibitors with some non-selective COX inhibitor [20-22].

Though the antiapoptotic mechanisms continue to exist uncertain, many studies demonstrate the significance of COX-mediated apoptosis in cancers of the esophagus [23], gallbladder [24], CNS [25], head and neck [26], hematopoietic system [27], lung [28], and pancreas [29].

COX inhibitors disrupt the balance between cell proliferation and apoptosis, thereby causing tumor regression [30, 31].

In this study, we aimed to investigate the binding potential of drug molecules used as COX inhibitors to the KRAS enzyme.

MATERIAL AND METHOD

Molecular Docking Studies

Preparation of Protein Structure

As the KRAS enzyme, the enzyme that has not undergone any mutation in the amino acid sequence and did not covalently bond with the ligand during the crystallization process was chosen from the Protein Data Bank (www.rcsb.org), the enzyme (PDB code: 4OBE [32], Guanosine-5'-Diphosphate as an inhibitor), which consists of two subunits and is obtained by the x-ray crystallization method, was used considering the resolution.

MOE 2020 (Molecular Operating Environment 2020) program was used to reduce the tension of the crystal structure and prepare the appropriate enzyme structure. Thanks to this program, polar and nonpolar hydrogens in the crystal structure of the macromolecules were first deleted and then added again, making the enzyme suitable. The resulting macromolecule structure protonated at the appropriate pH and temperature.

The energy of the enzyme is minimized by deleting the water molecules and the ligands used for crystallization. The AMBER 99 (Assisted Model Building with Energy Refinement) internal package program was used as a force field and saved as the moe file extension in this energy minimizing process.

The surface of the macromolecule was scanned, and optimization processes were performed to find the active sites on the enzyme.

Ligand Preparation

The 2D structures of ligand molecules were drawn in the ChemDraw 19.1 (Perkin Elmer Informatics) program and, the database was created by transferring to the MOE system. Polar and nonpolar hydrogens were added to this data, converted into a 3D structure, and then saved as a .mdb file extension. Here, 33 different molecules (Table 2) were optimized by converting them into a ligand dataset. MMFF 94x (Merck Molecular Force Field) package program, appropriate for small molecules, was used for the required energy minimizing process. This process was performed at the smallest possible gradient value.

Protein-Ligand Modeling Simulation

Molecular docking studies examine protein-protein or ligand-protein interactions and, these interaction results score with the binding affinity scoring method and show the bonds in the interaction [33]. The MOE 2020 program was used to form the modeling files. Here, the region where the switch-II lobe is located was chosen as the most suitable active site for the enzyme. It was measured that there was a sufficient interaction area for the ligand molecule in these regions and the obtained value was compared with the sizes of the ligands. The modeling study was limited to the 30 most stable conformers with different torsion angles for each ligand. The data obtained from the modeling were interpreted according to the RMSD (Root Mean Square Deviation) and S (Score) value which indicates the binding energy and binding affinity.

RESULT AND DISCUSSION

The S modeling value in MOE 2020 shows the bonding relationship between ligands and amino acids of the enzyme. Six different molecules (Table 1) were found to have better binding potential with KRAS protein taking into account the S value, binding energy, and RMSD values. In the docking studies, the presence of carboxyl acid or sulfonamide functional group in the NSAID molecules increased the hydrogen bond potential. It has been found that these polar structures increase the protein binding affinity as a hydrogen acceptor or donor. The presence of aromatic structures in the molecule is important for the interaction between the polar amino acid hydrogen and the π bonds of the molecule. In the pocket region of the receptor, Ser17, Gly13, Ile36, Lys16, Glu31 amino acids can be preferred as potential targets for hydrogen bonding. In addition, it has been understood that amino acids such as Gly 16, Thr 58, Ala 59, Asp30 are significant for receptor-ligand interaction in modeling.

In docking studies done using MOE, the low S (Binding affinity score) value is desirable. A hydrogen bond formed between the carboxylic acid functional group of the 3a molecule with the best

S-score and $-NH_2$ at the 6th position of the Lys16 amino acid (Figure 1). Moreover, having two separate carbonyl groups in the molecule increased the potential for hydrogen bonding. A hydrogen bond was also formed between the 3a ligand molecule and the NH proton of Gly13. It has been understood that the presence of aromatic structures in 3a and 3b ligand molecules is critical for ligand-receptor interaction. As can be seen from the obtained binding energies (Table 1), it has been understood that there must be a certain distance between the carbonyl group and the nonpolar part of the molecule for the molecule to bind to the receptor site with a high affinity.

There are two potential binding sites in the active pocket of the enzyme molecule [34]. The binding site of the phosphate molecule in this region (P-loop) is important for the potential to form hydrogen bonds when designing new drug molecules. The pocket in this region has a diameter of about 6 Å, and it was observed that NSAID molecules with a width smaller than this value settle better in this pocket. In this context, the preference of electron acceptor and donor structures in the phosphate-binding region, as well as the diameter of the molecule, can be considered significant for activity in drug design. (Figure 4).

Table 1. NSAID compounds and docking results showing the highest affinity

Docking Results			Molecular properties		
Molecules	S-Value	RMSD	MW	Log P	TPSA
3a	-6.1253	1.4724	254.28	3.40	54.37
4a	-5.9963	1.4197	357.79	3.93	68.53
1c	-5.9394	1.1059	250.2	3.04	57.53
3b	-5.6663	0.5745	242.27	3.67	46.53
3g	-5.4876	1.2526	293.32	4.03	63.33
3d	-5.4019	1.0822	206.28	3.07	37.3

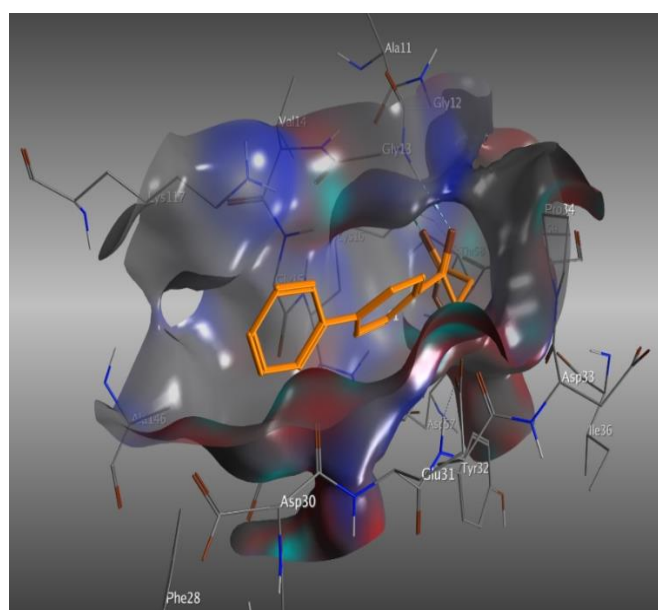


Figure 1. Binding pose of the 3a molecule with the active site of the KRAS enzyme (PDB ID: 4OBE)

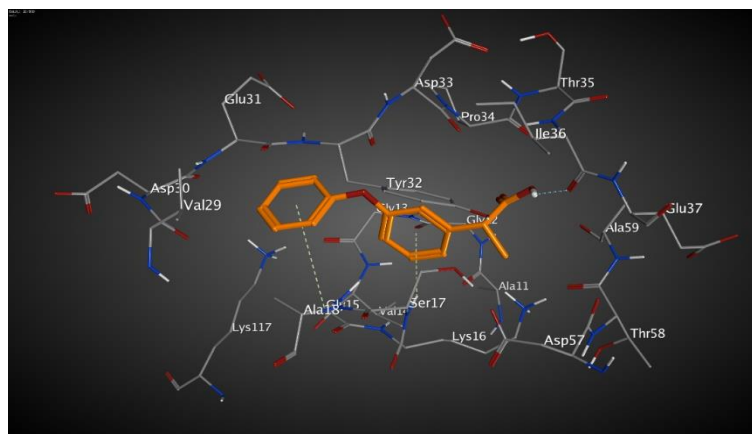


Figure 2. Binding pose of the 3b molecule with the active site of the KRAS enzyme (PDB ID: 4OBE)

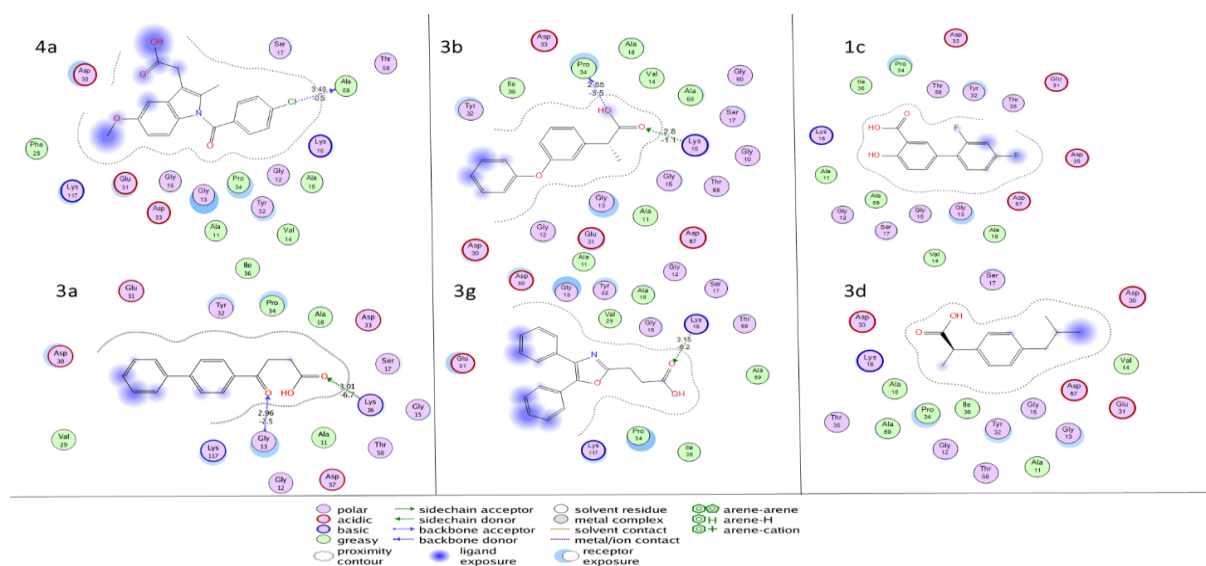


Figure 3. The active site of the human KRAS enzyme (PDB ID: 4OBE) and 2D binding poses with compounds 1c, 2a, 3a, 3b, 3g, 4a. Hydrogen bonding regions, binding energies, and distances are shown. Hydrogen bonds and polar- π , π - π , hydrophobic interactions are shown.

The second binding site of the enzyme is the area where GTP nucleosides are attached. In this region, a π -H bond is formed between the aromatic ring of the ligand and the -NH proton of the enzyme. Apart from this bond, this site is also a significant region for hydrophobic and π - π interactions. It was observed that the presence of structures such as naphthalene, heterocyclic rings, heteroaromatics, or aromatic rings with electron-donating groups increased the bonding. Furthermore, it can be assumed that a length above 10 Å between the polar part of the drug molecule and the aromatic ring is significant in creating a high interaction between the ligand and the protein. Among the NSAID molecules we docked (Table 3), it has been observed that the molecules complying with this rule had better binding energies. In salicylic acid derivative molecules such as 1a and 1b, a lower binding potential has been observed due to the short distance between the aromatic ring and the carboxylic acid.

Table 2. NSAID drug molecules and S-Values

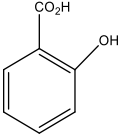
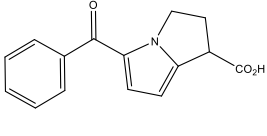
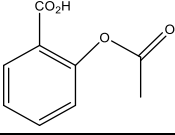
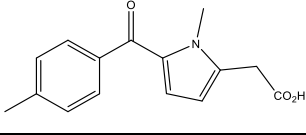
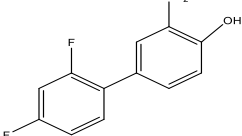
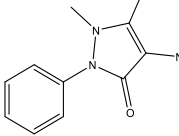
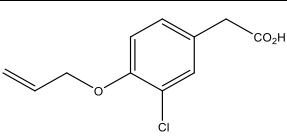
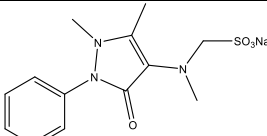
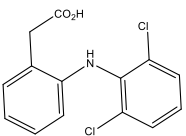
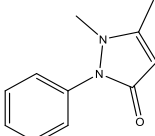
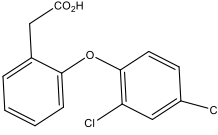
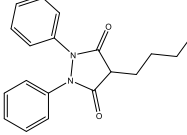
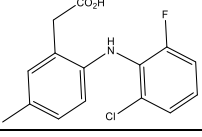
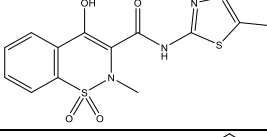
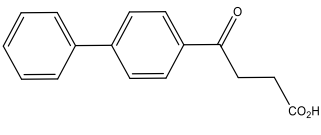
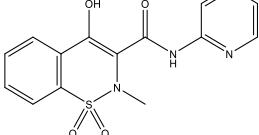
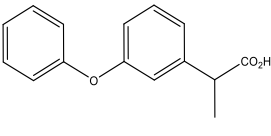
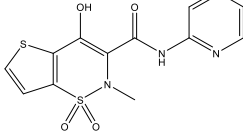
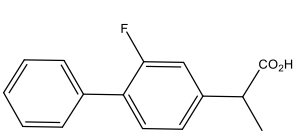
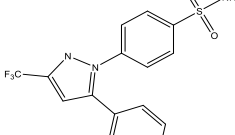
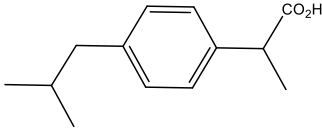
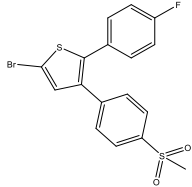
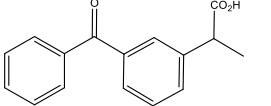
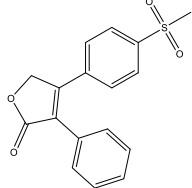
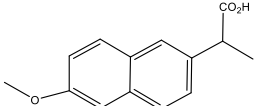
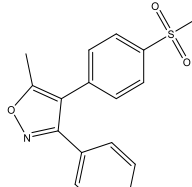
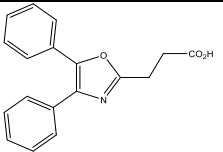
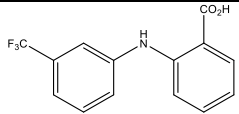
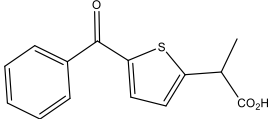
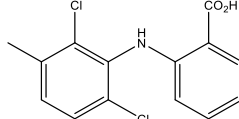
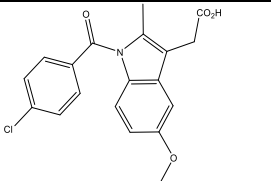
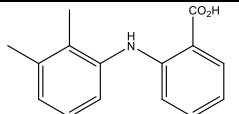
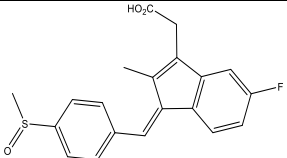
Compound	S Value	Compound	S Value
1a 	-4.4984	4c 	-4.8728
1b 	-4.1726	4d 	-4.7131
1c 	-5.9394	5a 	-3.8434
2a 	-5.3677	5b 	-5.0768
2b 	-4.9669	5c 	-3.9116
2c 	-4.3277	5d 	-4.6868
2d 	-4.5919	6a 	-4.7468
3a 	-6.1253	6b 	-4.5565
3b 	-5.6663	6c 	-4.5324
3c 	-5.2392	7a 	-4.5095

Table 2 (continued). NSAID drug molecules and S-Values

3d		-5.4019	7b		-4.7326
3e		-4.8891	7c		-5.1170
3f		-4.9346	7d		-4.7906
3g		-5.4876	8a		-4.5991
3h		-4.4148	8b		-5.0570
4a		-5.9963	8c		-4.5346
4b		-4.1314			

As a result, the KRAS enzyme is known very important in the formation of some cancer cells [35]. A more effective anticancer drug molecule can be designed by considering the 3D structure of the pocket in the active site of the enzyme and using the data from this docking study. In the following stages, more effective anticancer drug molecules can be obtained by design molecules with an appropriate diameter and length, having functional groups containing the suitable electron donor or acceptor.

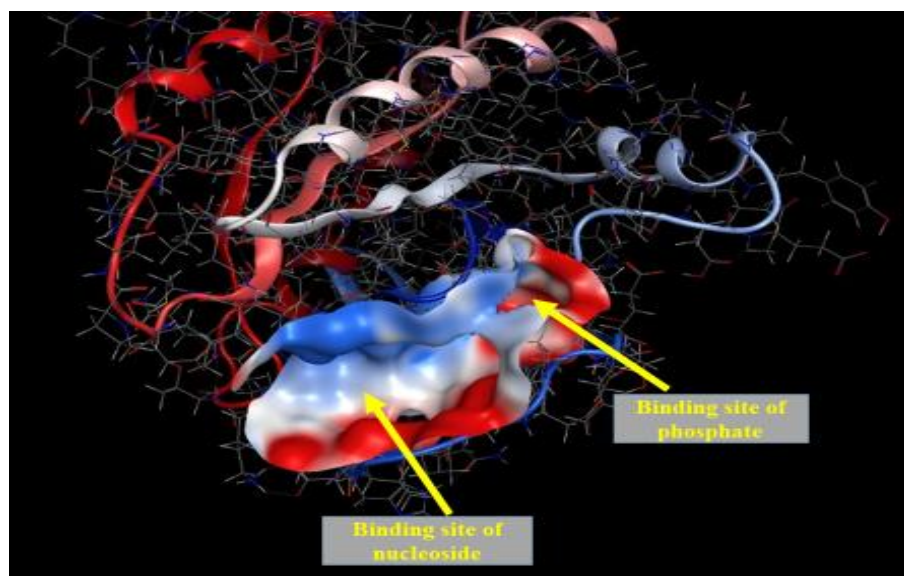


Figure 4. Binding sites and 3D structure of the active pocket of the wt-KRAS enzyme

Table 3. Binding energy values of NSAIDs which are a derivative of propionic acid and salicylic acid

Molecules	S-Value	Receptor	Bond	Distance (Å)	Energy (Kcal/Mol)
3a	-6.1253	Gly13	H-bond acceptor (HBAs)	2.96	-2.5
		Lys16	H-bond acceptor (HBAs)	3.01	-6.7
3b	-5.6663	Pro34	H-bond donor (HBDs)	2.85	-3.5
		Lys16	H-bond acceptor (HBAs)	2.80	-1.1
1a	-4.5459	Ser17	H-bond donor (HBDs)	3.18	-1.2
		Lys16	H-bond acceptor (HBAs)	2.76	-10.0
1b	-4.1726	Glu162	H-bond donor (HBDs)	3.05	-2.4

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception: *D.K.*; Design: *D.K., H.O.*; Supervision: *D.K., H.O.*; Resources: *D.K., H.O., Z.A.*; Materials: *D.K., H.O., Z.A.*; Data Collection and/or processing: *D.K., H.O.*; Analysis and/or interpretation: *D.K., H.O.*; Literature search: *D.K., H.O., Z.A.*; Writing manuscript: *D.K., H.O., Z.A.*; Critical review: *D.K., H.O.*; Other: *Z.A.*

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

The authors declare that the ethics committee approval is not required for this study.

REFERENCES

1. Sanchez-Vega, F., Mina, M., Armenia, J., Chatila, W.K., Luna, A., La, K.C., Dimitriadoy, S., Liu, D.L., Kantheti, H.S., Saghaflinia, S., Chakravarty, D., Daian, F., Gao, Q., Bailey, M.H., Liang, W.W., Foltz, S.M., Shmulevich, I., Ding, L., Heins, Z., Marino, M.C. (2018). Oncogenic signaling pathways in the cancer genome atlas. *Cell*, 173(2), 321-337. [\[CrossRef\]](#)
2. Harvey, J.J. (1964). An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature*, 204, 1104-1109. [\[CrossRef\]](#)
3. Kirsten, W.H., Mayer, L.A. (1967). Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *Journal of the National Cancer Institute*, 39(2), 311-335. [\[CrossRef\]](#)
4. Muñoz-Maldonad, C., Zimmer, Y., Medová, M. (2019). A comparative analysis of individual RAS Mutations in Cancer Biology. *Frontiers in Oncology*, 9, 1088. [\[CrossRef\]](#)
5. Fernández-Medarde, A., Santos, E. (2011). Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer*, 2(3), 344-358. [\[CrossRef\]](#)
6. Prior, I.A., Lewis, P.D., Mattos, C. (2012). A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Research*, 72, 2457-2467. [\[CrossRef\]](#)
7. Forbes, S.A., Bindal, N., Bamford, S., Cole, C., Kok, C.Y., Beare, D. (2011). COSMIC: Mining complete cancer genomes in the catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Research*, 39, (Database issue), D945–D950. [\[CrossRef\]](#)
8. Buday, L., Downward, J. (2008). Many faces of Ras activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1786, 178-187. [\[CrossRef\]](#)
9. Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., Bronson, R.T., Umanoff, H., Edelman, W., Kucherlapati, R., Jacks, T. (1991). K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes&Development*, 11(19), 2468-2481. [\[CrossRef\]](#)
10. Ahmed, A.U. (2011). An overview of inflammation: mechanism and consequences, *Frontiers in Biology*, 6, 274. [\[CrossRef\]](#)
11. Murata, M. (2018). Inflammation and cancer. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 23, 50. [\[CrossRef\]](#)
12. Kraft, M., Djukanovic, R., Wilson, S., Holgate, S.T., Martin, R.J. (1996). Alveolar tissue inflammation in asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 154, 1505-1510. [\[CrossRef\]](#)
13. Choy, E.H.S., Panayi, G.S. (2001). Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine*, 344, 907-916. [\[CrossRef\]](#)

14. Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C., Gage, F.H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140, 918-934. [\[CrossRef\]](#)
15. Hotamisligil, G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444, 860-867. [\[CrossRef\]](#)
16. Libby, P., Ridker, P.M., Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105, 1135-1143. [\[CrossRef\]](#)
17. Scrivo, R., Vasile, M., Bartosiewicz, I., Valesini, G. (2011). Inflammation as “common soil” of the multifactorial diseases, *Autoimmunity Reviews*, 10(7), 369-374. [\[CrossRef\]](#)
18. Eling, T.E., Thompson, D.C., Foureman, G.L. (1990). Prostaglandin H synthase and xenobiotic oxidation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 30, 1-45. [\[CrossRef\]](#)
19. Windmill, K.F., McKinnon, R.A., Zhu, X. (1997). The role of xenobiotic metabolizing enzymes in arylamine toxicity and carcinogenesis: functional and localization studies. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 376, 153-160. [\[CrossRef\]](#)
20. Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S. (1998). Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, 93, 705-716. [\[CrossRef\]](#)
21. Hernandez, G.L., Volpert, O.V., Iniguez, M.A. (2001). Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *Journal of Experimental Medicine*, 193, 607-620. [\[CrossRef\]](#)
22. Seed, M.P., Brown, J.R., Freemantle, C.N. (1997). The inhibition of colon-26 adenocarcinoma development and angiogenesis by topical diclofenac in 2.5% hyaluronan. *Cancer Research*, 57, 1625-1629.
23. Li, M., Lotan, R., Levin, B. (2000). Aspirin induction of apoptosis in esophageal cancer: a potential for chemoprevention. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 9, 545-549.
24. Grossman, E.M., Longo, W.E., Panesar, N. (2000). The role of cyclooxygenase enzymes in the growth of human gall bladder cancer cells. *Carcinogenesis*, 21, 1403-1409. [\[CrossRef\]](#)
25. Petersen, C., Petersen, S. L. (2000). Enhancement of intrinsic tumor cell radiosensitivity induced by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Clinical Cancer Research*, 6, 2513-2520.
26. Nishimura, G., Yanoma, S., Mizuno, H. (1999). A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses tumor growth in nude mouse xenografted with human head and neck squamous carcinoma cells. *Japanese Cancer Research*, 90, 1152-1162. [\[CrossRef\]](#)
27. Zhang, G., Tu, C., Zhou, G. (2000). Indomethacin induces apoptosis and inhibits proliferation in chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia Research*, 24, 385-392. [\[CrossRef\]](#)
28. Hida, T., Kozaki, K., Muramatsu, H. (2000). Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines. *Clinical Cancer Research*, 6, 2006-2011.

29. Yip-Schneider, M.T., Barnard, D.S., Billings, S.D. (2000). Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas. *Carcinogenesis*, 21, 139–146. [\[CrossRef\]](#)
30. Liu, X.H., Yao, S., Kirschenbaum, A. (1998). NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Research*, 58, 4245-4249.
31. Waddell, W.R. (1998). Stimulation of apoptosis by sulindac and piroxicam. *Clinical Science (London)*, 95, 385-388.
32. Hunter, J.C., Gurbani, D., Ficarro, S.B., Carrasco, M.A., Lim, S.M. (2014). In situ selectivity profiling and crystal structure of SML-8-73-1, an active site inhibitor of oncogenic K-Ras G12C. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 8895-8900. [\[CrossRef\]](#)
33. Sledz, P., Caflisch, A. (2018). Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*, 48, 93-102. [\[CrossRef\]](#)
34. McCarthy, M.J. , Pagba, C.V., Prakash, P., Naji, A.K., Hoeven, D. (2019). Discovery of high-affinity noncovalent allosteric KRAS inhibitors that disrupt effector binding. *ACS Omega*, 4, 2921-2930. [\[CrossRef\]](#)
35. Wang, Y., Kaiser, C. E., Frett, B., Li, H. (2013). Targeting mutant KRAS for anticancer therapeutics: A review of novel small molecule modulators. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(13), 5219-5230. [\[CrossRef\]](#)



ACINETOBACTER SPP. İZOLATLARINDA DIŞA ATIM POMPASI (DAP) İNHİBİTÖRLERİNİN MEROPENEMİN ETKİNLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ

EFFECT OF EFFLUX PUMP (DAP) INHIBITORS TO EFFICACY OF MEROPENEM ON ACINETOBACTER SPP. CLINICAL ISOLATES

Suzan ÖKTEN¹ , Alparslan Semih SALAN^{1*} , Gülcan KUYUCUKLU² ,
Fatma KAYNAK ONURDAĞ¹ 

¹Trakya Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, 22030, Edirne, Türkiye

²Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, 22030, Edirne, Türkiye

ÖZ

Amaç: Dirençli bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için yeni antimikrobiyal bileşiklerin sentezlenmesi çalışmalarının yanısıra, inhibitör moleküllerin antibiyotiklerle kombine kullanılmasına yönelik araştırmalar da yapılmaktadır. Çalışmamızda, fenilalanin-arjininbeta-naftilamid (PAβN), karbonil-siyanid m-klorofenilhidrazon (CCCP) ve 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP)'nin *Acinetobacter baumannii* klinik izolatlarında, meropenemin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) üzerine etkisinin saptanması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda kullanılmak üzere Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen *A. baumannii* izolatlarından meropeneme dirençli olduğu doğrulanan 50 *A. baumannii* izolatu çalışmaya alınmıştır. Meropenem duyarlılığı PAβN, CCCP ve NMP varlığında yeniden araştırılmıştır. Antimikrobiyal duyarlılık testleri mikrodilüsyon yöntemi ile yapılmıştır. Dama tahtası testi sonuçlarına göre FİK indeksleri hesaplanmış ve kombinasyonun etkisi sinerjik ya da aditif olarak tanımlanmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Sonuç olarak, izolatlarda meropenemin MİK değerlerini düşüren ideal konsantrasyonlar belirlenmiş olmakla birlikte, meropenemin miktarındaki artışın inhibitör konsantrasyonundaki azalmayla ya da inhibitör konsantrasyonundaki artışın meropenem konsantrasyonundaki azalmayla birlikte seyrettiği tespit edilmiştir. MİK değerlerinde ise, 8 kata kadar azalma görülmekle birlikte, meropenemin MİK değerini direnç sınırının altına düşüren inhibitör konsantrasyonu saptanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, DAP inhibitörü, meropenem

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Alparslan Semih Salan
e-posta / e-mail: asln1339@gmail.com

ABSTRACT

Objective: In addition to the synthesis of new antimicrobial compounds for the treatment of resistant bacterial infections, there are also studies on the use of inhibitor molecules in combination with antibiotics. In our study, it was aimed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of phenylalanine-arginine-beta-naphthylamide (PAβN), carbonyl-cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) and 1- (1-naphthylmethyl) - piperazine (NMP) on *Acinetobacter baumannii* clinical isolates (MIC).

Material and Method: To be used in our study, 50 *A. baumannii* isolates from *A. baumannii* isolates obtained from Trakya University Health Research and Application Center, which were confirmed to be resistant to meropenem, were included in the study. Meropenem susceptibility was re-investigated in the presence of PAβN, CCCP and NMP. Antimicrobial susceptibility tests were performed by microdilution method. FIC indexes were calculated according to the checkerboard test results and the effect of the combination was defined as synergistic or additive.

Result and Discussion: As a result, although ideal concentrations of meropenem that decrease MIC values were determined in isolates, it was determined that the increase in the amount of meropenem was accompanied by the decrease in the inhibitor concentration or the increase in the inhibitor concentration with the decrease in the meropenem concentration. Although the MIC values decrease up to 8 times, the inhibitor concentration that lowered the MIC value of meropenem below the resistance limit was not detected.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, DAP inhibitor, meropenem

GİRİŞ

Farklı nedenlerle hastanede hizmet alan bir hastada, hastaneye başvurduğu sırada kuluçka döneminde olmayan ve hastaneye yattıktan 48-72 saat sonra veya hastaneden ayrıldıktan sonraki 10 gün içinde gelişen enfeksiyonlar hastane enfeksiyonlarıdır [1-2]. *Acinetobacter spp.* son yıllarda hastane enfeksiyonlarının önemli bir nedeni olarak ortaya çıkan; non-fermentatif, Gram-negatif kokobasillerdir [3]. Oksidaz negatif olmaları ile *Pseudomonas* türlerinden ayrılır. *A. baumannii*'yi diğer türlerinden ayıran en önemli özelliği 44°C'de üreyebilme yeteneğidir [4]. *A. baumannii* enfeksiyonları sebebiyle hastaların ölüm oranları, genel hastane servislerinde %5 iken, yoğun bakım ünitelerinde %54 olabilmektedir [5]. Türkiye'de yoğun bakım ünitelerinde hastane enfeksiyonlarına neden olan Gram negatiflerin araştırılması amacıyla yapılan çok merkezli bir çalışmada; *Acinetobacter* türleri, Gram negatif basiller arasında üçüncü sıradadır ve antibiyotik direnç oranları da oldukça yüksektir [6]. Aynı zamanda son yıllarda yoğun bakım ünitelerinde ventilatörle ilişkili pnömonilerin etkeni olarak gösterilmektedir [7]. Yine yapılan bir çalışmada hastane kaynaklı pnömonilerin nedenleri arasında ilk sırada bildirilmiştir [8]. Trakya Üniversitesi Eğitim Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde de, *Acinetobacter* türleri sıklıkla izole edilmekte ve özellikle yoğun bakım ve cerrahi servislerinde ciddi problemlere neden olmaktadır. *A. baumannii* doğada ve insan deri florasında da bulunabildiğinden klinik örneklerden izole edilmektedir [9-10].

Acinetobacter baumannii, neden olduğu enfeksiyonlar açısından en önemli türdür. Bu suşların neden olduğu enfeksiyonlarda kullanılan antibiyotiklere karşı gelişen direnç, tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Çoğul antibiyotik direncinin artması tedavi olanağını azaltmaktadır [11,12]. Birçok *Acinetobacter* türü kinolonlar, karbapenemler ve sefalosporinler gibi antibiyotiklere

direnç göstermektedir. Kolistin tek tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda kolistine dirençli suşlar da bildirilmiştir. Bu durum, tedavide yeni arayışlara gidilmesi gerektiğini göstermektedir [11,13].

Acinetobacter baumannii'nin direnç mekanizmaları arasında; antimikrobiyal ajanların enzimatik modifikasyonu, membran geçirgenliğindeki değişiklikler, alternatif metabolik yollar, antimikrobiyal etki bölgesinde değişiklikler ve hücre içi ilaç konsantrasyonunun dışa atım pompa proteinleri yoluyla azaltılması sayılabilir [14].

DAP sistemi, oluşan direncin önemli faktörlerinden biridir çünkü bu sistemle ilacın hücre dışına atılması sağlanmaktadır [15]. Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler ATP'ye bağımlı aktif pompa sistemlerine sahiptir. Aktif pompa sistemlerinden bazıları mutasyonla indüklenebilir. Bu sistemler düzenleyici genlerle kontrol edilir. Düzenleyici genlerde görülen mutasyonlar DAP sisteminin fazla çalışmasına sebep olur. Bu durum antimikrobiyal ajanların dışarı atılmasına neden olmaktadır [15,16].

DAP proteinleri yüksek miktarda sentezlendiklerinde, birçok antimikrobiyal ajana karşı tek adımda yüksek düzey çoklu ilaç direncine sebep olmaktadır. DAP proteinleri bakterilerde yapısal düzeyde sentezlendiklerinde, metabolik son ürünlerin hücre dışına atılmasını ve bakterilerin birbirleriyle çevreleriyle ilişkilerini düzenlemesinde etkin rol oynar [17]. Bu proteinler sitoplazmik membranda yerleşim gösterirler. DAP proteinleri dış membran kanalı, periplazmik lipoprotein ve iç membran taşıyıcısı olmak üzere üç bileşen içerir [18]. DAP proteinleri aminoasit dizilimleri baz alınarak 5 süper protein ailesinde toplanmaktadır: "ATP binding cassette" süper ailesi (ABC), "Major facilitator" süper ailesi (MFS), "Small multi drug resistance" süper ailesi (SMR), "Çoklu ilaç ve toksik bileşik eldesi (Multi drug and toxic compound extrusion-MATE)" süper ailesi, "Resistance-nodulation-celldivision" (RND) süper ailesi [19].

RND süper ailesinde yer alan AdeABC, AdeDE, AdeIJK ve AdeFGH dışa atım pompaları *A. baumannii*'de çoklu ilaç direnci (MDR) gelişiminde önemli bir rol oynar [9].

İlk tanımlanmış RND sistemi AdeABC (*Acinetobacter* drug efflux ABC)'dir. ATP bağımlı bir dışa atım pompasıdır. AdeABC pompası, enerji kaynağı olarak proton motive edici gücü kullanmaktadır. İlaç molekülü hücre dışına pompalanırken gereken enerji, hücreye dış ortamda bir H⁺ iyonunun alınmasıyla sağlanır. AdeABC aktif ilaç pompasının substrat profili oldukça geniştir. Bu ilaç pompası; aminoglikozidler, florokinolonlar, tetrasiklinler, tigesiklin, kloramfenikol, eritromisin, trimetoprim, bazı betalaktamlar ve çok sayıda toksik maddeyi içerir [9,18,20].

Son yıllarda keşfedilen birçok bileşiğin dışa atım pompasını inhibe ettiği gösterilmiştir. NMP, CCCP ve PAβN gibi bileşiklerin dirençli Gram negatif bakterilerde meropenemin MİK (Minimum İnhibitör Konsantrasyon) değerinde azalmaya neden olduğu saptanmıştır [21,22]. Antibiyotik kombinasyonlarının, toksisite ve stabilite sorunlarından dolayı pompa inhibitörleri ile birlikte kullanılmasının tedavi için iyi bir alternatif olabileceği düşünülmektedir. Bu konuda devam eden

çalışmalar vardır. Bu çalışmaların sonucunda amaçlanan ise antibiyotik etkilerinin geri kazanımı ve dirençli bakterilerin önemli ölçüde azalmasıdır.

NMP ve PAβN, Gram negatif bakterilerde çoklu ilaç direncine neden olan RND pompa sistemlerini inhibe eder [6,23]. CCCP, bir diğer dışa atım pompası inhibitörüdür. CCCP protein pompasından madde geçişini arttırarak antibiyotiğin aktivitesinin artmasını sağlar. Yani proton iyonoforudur. ATP sentezini azaltmaktadır [21].

DAP inhibitörü maddeler DAP ilişkili direncin gösterilmesinde de kullanılmaktadır [21].

Tedavi için kombine antibiyotiklerin kullanılması veya antibiyotiğe karşı oluşan direnci inhibe eden bileşiklerin eklenmesi, son yıllarda tercih edilen yöntemler arasındadır [8]. Mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda bu inhibitörlerin bazı antimikrobiyal ajanların minimum inhibitör konsantrasyonunda azalmaya neden olduğu gösterilmiştir [22].

Sinerji testleri kombine bileşiklerin antimikrobiyal duyarlılıklarının saptanmasında uygulanır. Dama tahtası testi sıklıkla kullanılan sinerji testlerinden biridir [24].

Dama tahtası testinde, ilaçların konsantrasyonları 96 kuyucuklu plak üzerinde karşılaştırılarak kombinasyon etkinlikleri test edilir. İlaçların kombinasyondan elde edilen MİK değerleriyle tek başlarına olan MİK değerleri oranlanır ve fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) bulunur. Ardından kombinasyondaki ilaçların FİK değerleri toplanır ve FİK indeksi (FİKİ) hesaplanır. Her antimikrobiyal maddenin FİK değeri, üreme görülmeyen kuyudaki en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonunun, o maddenin tek başına aynı suşa karşı saptanan MİK değerine bölünmesi ile elde edilir [24,25].

Bu çalışmada, meropeneme dirençli *A. baumannii* klinik izolatlarında, PAβN, NMP ve CCCP DAP inhibitörlerinin, meropenemin MİK değeri üzerine etkisinin saptanması amaçlanmıştır. Bu amaçla, dama tahtası testi kullanılarak meropenem-inhibitör kombinasyonlarının FİK indeksleri hesaplanmış ve kombinasyonun etkisi sinerjik ya da aditif olarak tanımlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda CLSI M100-S25 [26] ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing- EUCAST) [27] tarafından önerilen kalite kontrol suşları olarak; *Pseudomonas aeruginosa* Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection- ATCC) 27853, *A. baumannii* ATCC 17978 ve Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş 50 *A. baumannii* izolatı kullanılmıştır.

Yöntem

Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

PAβN, dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde, CCCP, NMP ve meropenem distile suda çözülerek stok solüsyonları hazırlanmıştır. Çalışmada Mueller Hinton Agar (MHA) (Merck) ve Katyon ayarlı Mueller Hinton Broth (MHB) (Merck) kullanılmıştır. Besiyerleri 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [26]. Antimikrobiyal duyarlılık testi, CLSI M100-S25 önerileri doğrultusunda yapılmıştır [26]. MHA plaklarında üretilmiş olan *A. baumannii* kolonilerinden MHB besiyerlerine pasaj yapıp sıvı besiyerleri 37°C’de 18-24 saat inkübe edilmiş ve kültürün bulanıklığı, 0.5 McFarland standardına uygun bulanıklığa ulaşınca kadar üzerine sıvı besiyeri eklenerek ayarlanmıştır. McFarland yoğunluğu densitometre cihazı (Biosan) kullanılarak belirlenmiştir. Bakteri süspansiyonu McFarland 0.5 yoğunluğunda ayarlandıktan sonra 1:100 oranında dilüe edilerek 5×10^5 CFU/mL yoğunluğunda kullanılmıştır. Stok solüsyonları hazırlanan meropenem(Sigma), CCCP, NMP ve PAβN mikrodilüsyon plaklarının ilk kuyucuklarına 100 µL hacimde eklenerek, stok solüsyondaki madde konsantrasyonu çift katlı olarak sulandırılmıştır. Çok kanallı mikropipet kullanılarak çift katlı dilüsyona devam edilip mikrodilüsyon plaklarının takip eden kuyucuklarında da madde konsantrasyonu her defasında yarı yarıya azaltılmıştır. Dilüsyon işlemi tamamlandıktan sonra, mikrodilüsyon plağındaki her kuyucuğa, hazırlanan inokulum süspansiyonlarından 10 µL inokülasyon yapılmıştır. Ayrıca kullanılan tüm çözücülerin antimikrobiyal etkileri kontrol edilmiştir. Bakteri inoküle edilmiş mikrodilüsyon plakları 37°C’de 18-24 saat inkübe edilmiştir. MİK, mikroorganizmanın mikrodilüsyon kuyucuklarındaki üremesini tamamen inhibe eden en düşük madde konsantrasyonu olarak saptanmıştır. Böylece izolatların meropeneme olan duyarlılıkları ve MİK değerleri saptanmıştır.

Dama Tahtası Yöntemi

CCCP, NMP ve PAβN’in etkisinin araştırılması için izolatlar ile “meropenem ve PAβN”, “meropenem ve CCCP” ve “meropenem ve NMP” kullanılarak dama tahtası testi yapılmıştır. Çalışmamızda, antibiyotik konsantrasyonlarının standartlarda verilen MİK değerleri ile de yakın ve uyumlu olarak devam etmesi amaçlandığından konsantrasyonların çok küçülmesi istenmemektedir. Bu nedenle, kombinasyondaki inhibitör madde solüsyonu aynı plakta değil ayrı bir plakta dilüe edilerek, ilk maddenin konsantrasyonunun sütunda sabit kalmasını sağlanmıştır. Bu nedenle doksan altı kuyucuklu, U tabanlı mikrop plaklarda gerçekleştirilen dama tahtası yönteminde; mikrop plakların soldan sağa ilk 10 kuyucuğuna meropenemin seri sulandırılmaları, bir başka mikroplağın yukarıdan aşağı ilk 8 kuyucuğuna ise inhibitör maddenin seri sulandırılmaları dağıtılmış ve bu iki plağın içerikleri başka bir mikrop plakta birleştirilmiştir. Meropenem için kullanılacak ilaç sulandırım aralığı MİK değerlerine göre tespit edilmiştir. Kombinasyon testinin değerlendirilmesi fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) indeksine göre yapılmıştır.

Mikrodilüsyon Yöntemi Sonuçları

Mikrodilüsyon yöntemi ile yapılan duyarlılık testi sonucunda elde edilen MİK değerleri MİK değeri ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ ise duyarlı, $>8\mu\text{g/mL}$ ise dirençli olarak kabul edilmiştir [27]. İzolatların hepsinin meropeneme dirençli olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen MİK değerleri 16 $\mu\text{g/mL}$ 'nin üzerindedir.

İzolatların tamamında, NMP-meropenem ve CCCP-meropenem kombinasyonları aditif etki göstermiştir. Her iki inhibitörün meropenem ile kombinasyonunda MİK değerleri 2-8 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişmektedir. PA β N-meropenem kombinasyonu için, 49 izolata karşı aditif etki tespit edilirken, bu kombinasyonda tespit edilen aditif etkide de, MİK değerleri de 2-8 $\mu\text{g/mL}$ aralığındadır. Ayrıca, bu kombinasyonda, 11 numaralı izolata karşı sinerjik etki tespit edilmiştir.

NMP, CCCP ve PA β N'in 3,125 $\mu\text{g/mL}$ ve 6,25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonları varlığında meropenemin MİK değerlerinde sırasıyla 2-8 kat, 4-8 kat ve 2-4 kat azalmıştır.

Sinerjik etki tespit edilen izolat için "meropenem ve PA β N" kullanılarak yapılan dama tahtası testi sonuçları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. 11 numaralı izolat için meropenem-PA β N kombinasyonunun MİK değerleri

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0/0	256/0	128/0	64/0	32/0	16/0	8/0	4/0	2/0	1/0	0.5/0	0.25/0
0/25	256/25	128/25	64/25	32/25	16/25	8/25*	4/25*	2/25*	1/25*	0.5/25*	0.25/25*
0/12.5	256/12.5	128/12.5	64/12.5	32/12.5	16/12.5	8/12.5*	4/12.5*	2/12.5*	1/12.5*	0.5/12.5*	0.25/12.5*
0/6.25	256/6.25	128/6.25	64/6.25	32/6.25	16/6.25	8/6.25*	4/6.25*	2/6.25*	1/6.25*	0.5/6.25*	0.25/6.25*
0/3.125	256/3.125	128/3.125	64/3.125	32/3.125	16/3.125	8/3.125*	4/3.125*	2/3.125*	1/3.125*	0.5/3.125*	0.25/3.125*
0/1.5625	256/1.5625	128/1.5625	64/1.5625	32/1.5625	16/1.5625	8/1.5625*	4/1.5625*	2/1.5625*	1/1.5625*	0.5/1.5625*	0.25/1.5625*
0/0.78125	256/0.78125	128/0.78125	64/0.78125	32/0.78125	16/0.78125	8/0.78125*	4/0.78125*	2/0.78125*	1/0.78125*	0.5/0.78125*	0.25/0.78125*
0/0.390625	256/0.390625	128/0.390625	64/0.390625	32/0.390625	16/0.390625	8/0.390625*	4/0.390625*	2/0.390625*	1/0.390625*	0.5/0.390625*	0.25/0.390625*

* T Direnç sınırının altındaki meropenem MİK değerleri

Tablo 96 kuyucuklu mikroplağı temsil etmektedir. Tabloda koyu renk ile işaretlenen kuyucuklar üremenin olduğu, beyaz kuyucuklar üremenin olmadığı kuyucuklardır. FİK değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır [28-30]. PA β N'in, meropenemin MİK değerlerini direnç sınırının altına düşürdüğü konsantrasyonları da Tablo 1'de verilmiştir.

$$FİK M = MİK M_{\text{kombinasyon}}/MİK M$$

$$FİK P = MİK P_{\text{kombinasyon}}/MİK P$$

$$FİK = 4/256 + 0.390625/1.5625 = 0.015625 + 0.25 = 0.265625 \leq 0,5 \text{ sinerjik etki}$$

SONUÇ VE TARTIŞMA

Son yıllarda hastane enfeksiyonları tüm dünyada önemli bir sorun haline gelmektedir. Antimikrobiyal ajanlara dirençli *Acinetobacter* türleri hastane enfeksiyonlarında önemli bir rol oynamaktadır. Bu enfeksiyonları tedavi edebilmek için yeni bileşikler araştırılmaktadır ancak bakteriler bu bileşiklere direnç geliştirebilmektedir. Bu sebeple son yıllarda üzerinde durulan çalışmalar gelişen direncin inhibe edilmesine yönelik araştırmalar olmaktadır [31].

A. baumannii enfeksiyonlarının tedavisinde antibiyotiklerin tek başına kullanılmaması tedavide yeni arayışlara ihtiyacı zorunlu hale getirmiştir. Tedavinin düzenlenmesinde antibiyotik duyarlılık testleri önemini korumaktadır, özellikle tedavi seçiminde antibiyotiklerle inhibitör bileşiklerin, antibiyotik duyarlılık çalışmalarının yapılması tedavinin sonuçlarını daha doğru etkileyecektir.

MYSTIC çalışması, 2003 yılında *Acinetobacter* türlerinde karbapenem direncinin %14-16'ya ulaştığını göstermektedir [32]. Otuz yedi ülkede gerçekleştirilen bu araştırmada karbapenemlere en yüksek direnç oranı %27-38 ile ülkemizde görülmüştür [17-33]. *Acinetobacter* türlerinde karbapenem direnci ülkemizde yapılan çalışmalarda yıllar içerisinde farklı sonuçlar göstermiştir. Güriz ve ark. (34) 1999 yılında yaptıkları çalışmada, hastane enfeksiyonu etkeni olan 65 *Acinetobacter* spp. İzolatında imipenem direnç bulunmazken, 2008-2010 yılları arasında yapılan üç farklı çalışmada direnç oranları sırasıyla %70, %83 ve %84 olarak tespit edilmiştir [35]. Kurtoğlu ve ark [36], yaptıkları çalışmada karbapenem direncinin ise yıllara göre %50-83 oranında olduğunu saptamıştır. Ruiz ve ark. [37] altı yıllık bir periyotta 1532 *Acinetobacter* suşu ile yaptıkları çalışmada imipenem direncinin % 1.3'ten % 80'e çıktığını bildirmişlerdir.

Acinetobacter baumannii izolatları kromozomal ve plazmid kaynaklı farklı mekanizmalar ile antibiyotiklere direnç geliştirebilir. Dışa atım pompa (DAP) sistemleri ile gelişen direnç mekanizması son yıllarda önem kazanmıştır [38,39].

PAβN, tek başına kullanıldığında antibakteriyel etkisi olmamasına karşın Gram negatif bakterilerde RND tipi pompa sistemini inhibe ettiği bilinmektedir. NMP de RND pompa sistemlerini inhibe ederek Gram negatif bakterilerde çoklu ilaç direncine sebep olur. CCCP ise protein pompasından madde geçişini arttırarak antibiyotiğin etkisini arttırmaktadır.

Perez-Varela ve ark. [14]; *A. baumannii* izolatlarında sodyum dodesil sülfat, deoksikolat bileşikleri ile antibiyotikler arasında sinerjik etki olup olmadığını araştırmış, bileşiklerin eritromisin,

gentamisin ve kloramfenikol ile birlikte kullanıldıklarında bakterilerin duyarlılıklarında bir farklılığa neden olmadığını bildirmişlerdir.

Marshall ve ark. [40] tarafından yapılan çalışmada; kloramfenikol, tetrasiklin ve nalidiksik asitin dışa atım pompası inhibitörleri ile birlikte elde edilen MİK değerleri saptanmıştır. Çalışmada tanımlanan inhibitörlerin, kloramfenikolün MİK değerini *Salmonella* ve *E. coli* için, direnç sınır değerinin altına düşürdüğü bildirilmiştir. Enterobacterales için; dışa atım pompa inhibitörlerinin tetrasiklin veya nalidiksik asit ile kullanımı arasında da herhangi bir etki olmadığı belirtilmiştir. *Acinetobacter* spp. And *Pseudomonas* spp. için; dışa atım pompa inhibitörleri ile kloramfenikol, tetrasiklin, nalidiksik asit kullanımının direnç sınır değerlerine etkisinin belirlenemediği bildirilmiştir.

Çetinkaya ve ark. [41] çalışmaya aldıkları 58 *A. baumannii* izolatının %15,5'inde 25 mg/L PaβN varlığında siprofloksasin MİK değerlerinde 4 kat ve daha fazla azalma tespit etmiş ve 100 mg/L PaβN varlığında bu oranın %39,6'ya çıktığını bildirmişlerdir. Ancak çalışmaya alınan tüm izolatlar siprofloksasine dirençli değildir ve dokuz izolatın siprofloksasine dirençli iken duyarlı hale geldiği bildirilmiştir. Çoban ve ark [42]; çalışmaya aldıkları 42 *A. baumannii* izolatının 19'unun siprofloksasine duyarlı, 17 izolatın ise siprofloksasine dirençli olduğunu bildirmiş ve NMP varlığında siprofloksasin duyarlılığını disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri ile tekrar çalışmışlardır. On yedi dirençli izolatın 16'sının orta duyarlı iken duyarlı hale geldiğini, 1 dirençli izolatın da orta duyarlı hale geldiğini bildirmişlerdir. 100mg/L NMP varlığında tüm izolatlarda MİK değerlerinde 4 kat ve daha fazla azalma tespit etmişlerdir.

Pannek ve ark. [43], *Acinetobacter baumannii* ve NMP ile yaptıkları çalışmada, 25 mg/L NMP varlığında konsantrasyonlarda kayda değer bir azalma tespit edemediklerini bildirmişlerdir. Çalışmada 100 mg/L NMP kullanıldığında daha fazla izolatın MİK değerlerinde azalma tespit edilmiştir.

Cortez-Cordova ve ark. [44] tarafından yapılan bir çalışmada; PaβN'in *Acinetobacter baumannii* suşlarının direnç gelişimi üzerine etkisi araştırılmış olup bu inhibitör maddenin AdeFGH dışa atım pompasını inhibe ederek trimetoprim, kloramfenikol ve klindamisinine karşı direnç gelişimini engellediği belirtilmiştir.

Vera-Leiva ve ark. [45] ise yaptığı çalışmada; *Klebsiella* izolatlarında, PaβN varlığında karbapenem MİK değerlerinin beklenilenin aksine arttığını göstermiştir. Çalışmamızda, PaβN varlığında meropenem MİK değerinin azaldığı hatta direnç sınırının altına düştüğü gözlemlenmiştir. Sonuçlarımızda inhibitör etkinin görülmesi, çalışmaya aldığımız izolatlarda direnç mekanizmasının DAP proteinlerinin aşırı ekspresyonu sonucu olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda, izolatlarda meropenemin MİK değerlerini düşüren ideal konsantrasyonlar belirlenmiş olmakla birlikte, kombinasyondaki konsantrasyonlara bakıldığında meropenemin miktarındaki artışın inhibitör konsantrasyonundaki azalmayla ya da inhibitör konsantrasyonundaki artışın meropenem konsantrasyonundaki azalmayla birlikte seyrettiği tespit edilmiştir. Ancak,

meropenemin konsantrasyonunun direnç sınırının altında olduğu konsantrasyonların tedavide tercih edilmesinin daha uygun olduğu düşünülmektedir. İnhibitörlerle yapılan çalışmalar, etkili olan yüksek ilaç konsantrasyonlarının direnç sınırının altına inmesine ve tedaviye tekrar kazandırılmalarına olanak sağlayabilir. Bununla birlikte Xu ve ark. [46] da belirttiği gibi, etkili ilaç konsantrasyonları düşürülerek toksik etki de azaltılabilir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: S.Ö., A.S.S.; Tasarım: S.Ö., F.K.O.; Denetim: S.Ö., F.K.O.; Kaynaklar: S.Ö., F.K.O.; Malzemeler: A.S.S., G.K., S.Ö.; Veri Toplama ve/veya işleme: A.S.S., G.K.; Analiz ve/veya yorumlama: A.S.S., G.K., S.Ö., F.K.O.; Literatür taraması: A.S.S., G.K.; Makalenin yazılması: A.S.S., G.K.; Kritik inceleme: F.K.O., S.Ö.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

ETİK KURUL ONAYI

Çalışmamız için T.C. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 29.04.2015 tarihinde onay alınmıştır. Karar no: TÜTF-BAEK-2015/55-08/10.

KAYNAKLAR

1. Karagöl, Ç. (2008). Tıpta Uzmanlık Tezi. Hastane Kökenli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları ve İmipenem Dirençli İzolatların Genotiplenmesi. Tıp Fakültesi, Trakya Üniversitesi, Edirne, Türkiye.
2. Erbay, A. (2009). Yüksek Lisans Tezi. Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde Hastaneden Edinilmiş *Acinetobacter baumannii* Bakteriyemilerinde Fatalite Hızı ve İlgili Risk Etmenleri. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye.
3. Zarrili, R., Giannouli, M., Tomasone, F., Triassi, M., Tsakris, A. (2009). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *Journal of Infection in Developing Countries*, 1;3(5), 335-341. [CrossRef]
4. Yıldırım, Mustafa İ. (2006). Tıpta Uzmanlık Tezi. Sefaperazon-Sulbaktam, İmipenem ve Sefepimin Antibiyoterapi Etkinliklerinin Çoğul Dirençli ve Duyarlı *Acinetobacter baumannii* ile Oluşturulan Deneysel İkili Apse Modelinde Karşılaştırılması. Tıp Fakültesi, Trakya Üniversitesi, Edirne, Türkiye.

5. Moubareck, A.C., Halat, H.D. (2020). In sights into *Acinetobacter baumannii*: A review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. *Antibiotics*, 12;9(3), 119. [\[CrossRef\]](#)
6. Yücesoy, M., Yuluğ, N., Kocagöz, S., Ünal, S., Çetin, S., Çalungu, S. And Study Group. (2000). Antimicrobial resistance of Gram-negative isolates from intensive care units in Turkey. Comparison to previous three years. *Journal of Chemotherapy*, 12, 294-298. [\[CrossRef\]](#)
7. Azap, Ö. (2012). MDR *Acinetobacter* infeksiyonlarında epidemiyolojik anlamda güncel durum. *ANKEM Dergisi*, 26, 283-286.
8. Dede, B., Kadanalı, A., Karagöz, G., Çomoğlu, Ş., Bektaşoğlu, M.F., Yücel, F.M. (2013). Yoğun bakım ünitesinde izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik dirençlerinin araştırılması. *Bakırköy Tıp Dergisi*, 9(1), 20-23. [\[CrossRef\]](#)
9. Dal, T., Dal, M., Agır, İ. (2012). *Acinetobacter baumannii*'de antibiyotik direnci ve AdeABC aktif pompa sistemleri: *Van Tıp Dergisi*, 19(3), 137-148.
10. Keyik, Ş. (2013). Yüksek Lisans Tez. *Acinetobacter baumannii* Suşlarında OXA-23 ve OXA-58 Tipi Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Varlığının Araştırılması ve PFGE Yöntemiyle Klonal Yakınlığının İncelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı, Selçuk Üniversitesi, Konya, Türkiye.
11. Yolbaş, İ., Tekin, R., Güneş, A., Kelekçi, S., Şen, V., Tan, İ., Uluca, Ü. (2013). Bir üniversite hastanesindeki *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 4(3), 318-321. [\[CrossRef\]](#)
12. Özseven, A.G., Çetin-Sesli E., Arıdoğan, Cicioğlu B. (2012). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik direnç profilleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 42(2), 55-60.
13. Saçar, S., Turgut, H., Cenger, H.D., Coşkun, E., Asan, A., Kaleli, İ. (2008). Post travmatik çoklu ilaç dirençli *Acinetobacter baumannii* menenjitli olguda yüksek doz meropenem ile başarılı tedavi. *Pamukkale Tıp Dergisi*, 1, 39-41.
14. Pérez-Varela, M., Corral, J., Aranda, J., Barbéa, J. (2019). Roles of efflux pumps from different superfamilies in the surface-associated motility and virulence of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 63, e02190-18. [\[CrossRef\]](#)
15. Işık, Y. (2008). Yüksek Lisans Tez. *Pseudomonas aeruginosa* Kökenlerinde Kinolon Direncinin Moleküler Olarak Saptanması. Gazi Üniversitesi, Ankara, Türkiye.
16. Pazarlı, O. (2010). Tıpta Uzmanlık Tezi. Kinolon Dirençli *Escherichiacoli* ve *Klebsiella* spp. Suşlarında Direnç Genlerinin Araştırılması. Tıp Fakültesi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Zonguldak, Türkiye.
17. Coyne, S., Courvalin, P., Pe'richon, B. (2011). Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(3), 947-953. [\[CrossRef\]](#)
18. Abdi, N.S., Ghotaslou, R., Ganbarov, K., Mobed, A., Tanomand, A., Yousefi, M., Ashgarzadeh, M., Kafil, Samed H. (2020). *Acinetobacter baumannii* efflux pumps and antibiotic resistance. *Infection and Drug Resistance*, 13, 423-434. [\[CrossRef\]](#)

19. Kor, S.B., Tou, B.S.Y., Chieng, C.K.L., Hiew, M.S.Y., Chew, C.H. (2014). Distribution of the multi drug efflux pump genes *adeA*, *adeI*, *adeJ*, *adeY* and integrons in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Malaysian Hospitals. *Biomedical Research*, 25(2), 143-148.
20. Xing, L., Barnie, P.A., Su, Z., Xu, H. (2014). Development of efflux pumps and inhibitors (EPIs) in *A. baumannii*. *Clinical Microbiology*, 3, 135.
21. Dal, T., Dal, M., Agır, İ. (2012). *Acinetobacter baumannii*'de antibiyotik Direnci ve AdeABC aktif pompa sistemleri, *Van Tıp Dergisi*, 19(3), 137-148.
22. Aygöl, A. (2015). Antibiyotik direncinde dışa atım sistemlerinin ve dirençle mücadelede dışa atım pompa inhibitörlerinin önemi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 49(2), 278-291. [\[CrossRef\]](#)
23. Çoban, A.Y., Bayram, Z., Sezgin, F.M., Durupınar, B. (2009). Effect of efflux pump inhibitor 1-(1-naphthylmethyl)-piperazineto MIC values of ciprofloxacin in ciprofloxacin resistant Gram negative bacteria. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 43(3), 457-461.
24. Özseven, G.A., Çetin-Sesli E., Özseven, L. (2012). Dama tahtası sinerji testi sonuçlarının farklı yöntemlerle yorumlanması sonuçlarımızı etkiliyor mu? *Mikrobiyoloji Bülteni*, 46(3), 410-420.
25. Döşler, S., Gürler, B. (2006). Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin tek başına ve kombinasyon halindeki etkilerinin araştırılması. *ANKEM Dergisi*, 20(3), 173-179.
26. Clinical Laboratory Standards Institute. (2015). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty first informational supplement. M100-S25. Wayne, Philadelphia.
27. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, Version 2, July 2017.
28. Pendland, S.L., Messick, C.R., Jung, R. (2002). In vitro synergy testing of levofloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin in combination with aztreonam, ceftazidime, or piperacillin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 42, 75-78. [\[CrossRef\]](#)
29. Giacometti, A., Cirioni, O., Kamysz, W., D'Amato, G., Silvestri, C., Licci, A., Nadolski, P., Riva, A., Lukasiak, J., Scalise, G. (2005). In vitro activity of MSI-78 alone and in combination with antibiotics against bacteria responsible for blood stream infections in neutropenic patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 235-240. [\[CrossRef\]](#)
30. Chan, B.C.L., Ip, M., Lau, C.B.S., Lui S.L., Jolival, C., Ganem-Elbaz, C., Litaudon, M., Reiner, E N., Gong, H., See, H R., Fung, P K., Leung P C. (2011). Synergistic effects of baicalein with ciprofloxacin against NorA-overexpressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and inhibition of MRSA pyruvatekinase. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 767-773. [\[CrossRef\]](#)
31. Yılmaz, S., Altınkanat-Gelmez, G., Bolelli, K., Guneser-Merdan, G., Over-Hasdemir, M.U., Yıldız, İ., Yalçın, İ., Akı-Yalçın, E. (2014). Pharmacophore generation of 2-substituted benzothiazoles as AdeABC efflux pump inhibitors in *A. baumannii*. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 25(7), 551-63. [\[CrossRef\]](#)

32. Turner, P.J., Greenhalgh, J.M. (2003). MYSTIC Study Group (Europe): The activity of meropenem and comparators against Acinetobacters strains isolated from European hospitals, 1997-2000. *Clinical Microbiology and Infection*, 9, 563-567. [\[CrossRef\]](#)
33. Sader, H.S., Castanheira, M., Mendes, R.E., Toleman, M., Walsh, T.R., Jones, R.N. (2005). Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *International Journal Antimicrobial Agents*, 25(1), 57-61. [\[CrossRef\]](#)
34. Güriz, H., Aysev, D., Yavuzdemir, Ş. (1999). Hastane enfeksiyonlarından etken olarak izole edilen Acinetobacter suşlarının antimikrobilyallere duyarlılıkları. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 33(4), 289-296.
35. Çevik, F.Ç., Naz, H., Aykın, N., Korkmaz, P. (2010). Yunus Emre Devlet Hastanesi yoğun bakım ünitelerindeki *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonları. 3.Türkiye EKMUD Kongresi, 12-16 Mayıs 2010, Ankara, p.120.
36. Kurtoğlu, M.G., Opuş, A., Kaya, M., Keşli, R., Güzelant, A., Yüksekaya, Ş. (2011). Bir eğitim ve araştırma hastanesinde klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında antibakteriyel direnç (2008-2010). *ANKEM Dergisi*, 25(1), 35-39. [\[CrossRef\]](#)
37. Ruiz, J., Núñez, M.L., Pérez, J., Simarro, E., Martínez-Campos, L., Gómez, J. (1999). Evolution of resistance among clinical isolates of Acinetobacter over a 6-year period. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease*, 18, 292-5. [\[CrossRef\]](#)
38. Van, Bambeke F., Balzi, E., Tulkens, M.P. (2000). Antibiotic efflux pumps. *Biochemical Pharmacology*, 60(4), 457-70. [\[CrossRef\]](#)
39. Hasdemir, U. (2007). Çoklu İlaç Direncinde Bakteri Hücre Duvarı Organizasyonu ve Aktif Pompa Sistemlerinin Rolü. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 41, 309-327.
40. Marshall, R.L., Lloyd, G.S., Lawler, A.J. Element, J S., Kaur, J., Ciusa, Laura M., Ricci, V., Tschumi, A., Kühne, H., Alderwick, J L., Piddock, V J L. (2020). New Multi drug Efflux Inhibitors for Gram-Negative Bacteria. *ASM Journals/ mBio*, 11, e0134020. [\[CrossRef\]](#)
41. Çetinkaya, E., Çoban, A.Y., Durupinar, B. (2008). Investigation of the effect of efflux pump inhibitors to MIC values of ciprofloxacin in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus*. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 42(4), 553-561.
42. Coban, A.Y., Guney, K.A., Cayci, T.Y., Durupinar, B. (2011). Effect of 1-(1-Naphthylmethyl)piperazine, an Efflux Pump Inhibitor, on Antimicrobial Drug Susceptibilities of Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates. *Current Microbiology*, 62, 508-511. [\[CrossRef\]](#)
43. Pannek, S., Higgins, G.P., Steinke, P., Jonas, D., Akova, M., Bohnert, A, J., Seifert, H., Kern, V W. (2006). Multi drug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-b-naphthylamide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 970-974. [\[CrossRef\]](#)
44. Cortez-Cordova, J., Kumar, A. (2011). Activity of the efflux pump inhibitor phenylalanine - arginine β -naphthylamide against the AdeFGH pump of *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37, 420-424. [\[CrossRef\]](#)

45. Vera-Leiva, A., Carrasco-Anabalón, S., Lima, C.A., Villagra, N., Dominguez, M., Bella-Toledo, H., Gonzalez-Rocha, G. (2018). The efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine β -naphthylamide (PA β N) increases resistance to carbapenems in Chilean clinical isolates of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 12, 73-76. [\[CrossRef\]](#)
46. Xu, C., Bilya, R.S., Xu, W. (2019). *adeABC* efflux gene in *Acinetobacter baumannii*. Elsevier Ltd, *New Microbes and New Infections*, 30, 100549. [\[CrossRef\]](#)



TAURİN, KAPSAİSİN, MELATONİN VE BETA KAROTENİN L929 SAĞLIKLI HÜCRELER VE MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİPROLİFERATİF, ANTİMİGRASYON VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

THE INVESTIGATION OF THE ANTIPROLIFERATIVE, ANTIMIGRATION AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF TAURINE, CAPSAICIN, MELATONIN AND BETA CAROTEN ON L929 HEALTHY CELLS AND MCF-7 BREAST CANCER CELLS

Hande YÜCE¹ , Neşe Başak TÜRKMEN¹ , Dilan Aşkın ÖZEK^{1,2} , Songül ÜNÜVAR^{1*} 

¹İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı, 44000, Malatya, Türkiye

²Fırat Üniversitesi, Kovancılar Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri Bölümü, 23000, Elazığ, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, taurin, kapsaisin, melatonin ve beta karoten gibi antioksidan maddelerin insan meme kanseri ve sağlıklı fibroblast hücreleri üzerindeki antiproliferatif, antimigrasyon ve antioksidan aktivitelerini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, taurin, kapsaisin, melatonin ve beta karoten L929 sağlıklı fibroblast hücrelerine ve MCF-7 meme kanseri hücrelerine uygulandı. Bileşiklerin antiproliferatif etkisi, MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4sülfofenil)-2H-tetrazolyum] testi ile 24. ve 48. saatte belirlendi. Hücreler, Dulbecco'nun Modifiye Eagles Ortamı (DMEM) içinde kültürlendi ve ardışık iki gün boyunca farklı konsantrasyonlarla işleme tabi tutuldu. Bileşiklerin hücre göçü üzerindeki etkisi, yara iyileşme deneyi kullanılarak 24. saatte değerlendirildi. Yara iyileşme testi, hücrelerin in vitro metastatik kabiliyetini ölçmek için kullanıldı. Total antioksidan seviyeleri (TAS) ve total oksidan seviyeleri (TOS) ticari kitler kullanılarak belirlendi.

Sonuç ve Tartışma: Tüm bileşikler sağlıklı hücelere kıyasla, malign hücrelerde hücre canlılığını konsantrasyona ve zamana bağlı bir şekilde azaltmıştır. Yara kapanma alanının sonuçları, bileşiklerle tedavinin, yara kapanmasını önemli ölçüde hızlandıran hücresel göçü iyileştirdiğini göstermiştir. Sonuçlar, tüm

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Songül Ünüvar
e-posta / e-mail: songul.unuvar@inonu.edu.tr, Tel. / Phone: +905062454054

bileşiklerin, 48 saatte MCF-7 hücre hatlarının göç kabiliyetini belirgin şekilde inhibe ettiğini gösterdi. Tüm bileşikler antioksidan etki göstermekle birlikte, MCF-7 hücreleri üzerine hemen hemen tüm dozlarda antioksidan etki gösteren bileşiğin beta karoten olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Beta karoten, kapsaisin, melatonin, meme kanseri, taurin

ABSTRACT

Objective: *The aim of this study was to evaluate the antiproliferative, antimigration and antioxidant activities of antioxidant substances such as taurine, capsaicin, melatonin and beta carotene on human breast cancer cells.*

Material and Method: *In this study, taurine, capsaicin, melatonin and beta carotene L929 were applied to healthy fibroblast cells and MCF-7 breast cancer cells. The antiproliferative effect of the compounds was determined by the MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4sulphophenyl)-2H-tetrazolium] test at 24 and 48 hours. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) and treated with different concentrations for two consecutive days. The effect of compounds on cell migration was evaluated at 24 hours using the wound healing assay. The wound healing test was used to measure the in vitro metastatic ability of cells. Total antioxidant levels (TAS) and total oxidant levels (TOS) were determined using commercial kits.*

Result and Discussion: *All compounds decreased cell viability in malignant cells in a concentration- and time-dependent manner compared to healthy cells. The results of the wound closure area showed that treatment with the compounds improved cellular migration, which significantly accelerated wound closure. The results showed that all compounds markedly inhibited the migratory ability of MCF-7 cell lines at 48 hours. Although all compounds showed antioxidant effects, beta carotene was observed to have antioxidant effects on MCF-7 cells at almost all doses.*

Keywords: Beta carotene, breast cancer, capsaicin, melatonin, taurine

GİRİŞ

Küresel bir halk sağlığı sorunu olan meme kanseri tüm dünyada en sık görülen kadın kanseridir. Kadınlarda yüksek mortalite ile ilişkili olarak, önde gelen kansere bağlı ölüm nedenlerinden birisidir [1]. Hastalar için ileri meme kanseri tedavileri, adjuvan hormon tedavisi, kemoterapi veya radyoterapi uygulanır. Birçok kemoterapötik ilaç hızla çoğalan hücreleri hedefler; bununla birlikte, kemik iliği, bağırsak mukozası, ağız mukozası, kıl folikülleri ve gonadlar gibi hızla çoğalan normal dokular üzerinde de aynı etkiye sahiptirler. Bu nedenle, sağlıklı hücreleri etkilemeden kanser hücrelerini öldürmek için etkili bir yöntem bulmak önemlidir [2].

Fitokimyasalların, kanser tedavisi ilaçları kadar antioksidan ve kanser önleyici etkilere de sahip olduğu iyi bilinmektedir. Bu biyoaktif maddelerin çoğunun, hücre döngüsü ilerlemesini bloke ederek ve tümör hücresi apoptozunu tetikleyerek antikanser etkiler sergiledikleri rapor edilmiştir [3].

Kapsaisin (trans-8-metil-N-vanilil-6-nonenamid), acı biberin etken maddesidir [4]. Kapsaisin, gıda katkı maddesi ve ilaç olarak uzun süredir kullanılmaktadır [5]. Birçok kanser hücre hattında antikarsinojenik, antimutajenik ve kemopreventif etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Kapsaisinin tahriş edici ve keskin özelliği nedeniyle tümörleri indüklediği düşünülmektedir [4,5]. Karsinogenez üzerindeki etkilerine ilişkin hayvan çalışmalarından elde edilen raporlarda, kapsaisinin kendisinin mutajenik olduğu ve tümör oluşumunu desteklediği bildirilmiştir [4]. Kapsaisinin, in vitro olarak transforme olan

hücre tiplerinde büyümeyi inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği, ancak normal hücrelerde bu etkiyi göstermediği bulunmuştur [5].

Beta karotenin anti-kanserojen ve antioksidan özellikleri bilinmesine rağmen, son zamanlardaki birkaç epidemiyolojik ve deneysel çalışmada yüksek konsantrasyonlarda (30 mg/gün) pro-oksidan gibi davrandığı ve kansere neden olduğu gösterilmiştir [6]. In vitro deneyler ayrıca, beta karotenin düşük dozlarda (6 mg/gün) insan kanser hücrelerinde antioksidan ve anti-inflamatuvar özellikler sergilediğini, yüksek dozlarda ise pro-oksidan ve pro-inflamatuvar etkiler gösterdiğini doğrulamaktadır [7]. Beta karoten, birçok insan kanser hücre hattının büyümesini inhibe ederek hücre döngüsünün durmasını ve apoptozu indükler. Beta karotenin, hücre döngüsü ilerlemesinin önemli bir düzenleyicisi olan siklin A'nın azaltılmasından sorumlu olduğu bildirilmiştir [6-8]. İn vitro çalışmalar, bu karotenoidin prostat ve melanom dahil olmak üzere bazı kanser türlerine karşı kemopreventif veya kemoterapötik olduğu hipotezini desteklemektedir [8].

İnsanlarda en çok bulunan serbest amino asit olan Taurin (Tau), antioksidan ve anti-inflamatuvar özellikleri sayesinde sayısız potansiyel sağlık yararına sahiptir. Bununla birlikte, sınırlı çalışmalar tümörler üzerindeki etkisini değerlendirmiştir ve antitümör mekanizması bilinmemektedir [9]. Genellikle taurin olarak bilinen amino asit 2-aminoetansülfonik asit, bir tiyol grubu içeren basit bir kimyasal yapıya sahiptir. Taurin, toplam insan vücut ağırlığının <math><0,1\%</math>'ini oluşturur ve tüm organlarda serbest formda bulunur [10].

Melatonin; antioksidan, immünomodülatör ve yaşlanma karşıtı özellikleri sayesinde sirkadiyen ritimlerin düzenlenmesinden tümör inhibisyonuna kadar farklı fizyolojik fonksiyonlara sahiptir. Pleiotropik fonksiyonları nedeniyle, melatoninin normal hücrelerde sitoprotektif süreçleri ortaya çıkardığı ve kanser hücrelerinde proapoptotik sinyalleri tetiklediği gösterilmiştir [11].

Bu çalışmada, kapsaisin, β -karoten, taurin ve melatonin uygulamasının sağlıklı hücre hattı vememe kanseri hücre hattı üzerindeki antiproliferatif, antimigrasyon ve antioksidan etkilerini araştırdık. Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız bu dört bileşiğin antikanser ve antioksidan aktivitelerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği ilk çalışmadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre Kültürü

İnsan meme kanseri hücreleri (MCF-7) ve sağlıklı fare fibroblast hücreleri (L929) Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) temin edildi. L929 ve MCF-7 hücreleri 25 cm²'lik flasklarda, %10 Fetal sığır serumu, %1 Penisilin/Streptomisin içeren DMEM (Sigma Chemical Co.) kullanılarak, 37°C, %5 kısmi CO₂ basıncı ve nemli ortam içeren inkübatörler içerisinde yetiştirildi. Hücreler, tripsin-EDTA (% 0.25) ile haftada 2-3 kez pasajlandı ve fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. Hücreler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve DMEM içinde istenen konsantrasyona yeniden süspanse edildi. Kapsaisin,

beta karoten, taurin ve melatonin sırasıyla (Alfa-Aesar (Cas: 404-86-4), Fluka Analytical (Cas: 7235-40-7), Carl Roth (Cas: 107-35-7), Merck (Cas: 73-31-4) firmalarından temin edildi. Stok solüsyonları dimetil sülfoksit (DMSO) içinde hazırlanarak, 1 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM konsantrasyonlara seyreltildi.

Sitotoksisite Deneyi

Hücrelerin yaşaması ve proliferasyonu, MTS testi ile kantitatif ve kolorimetrik olarak belirlendi. MTS testinin yapılması için MCF-7 ve L929 hücreleri 96 kuyucuklu plakalar içerisine 24 saat önceden 5000 hücre/kuyu olacak şekilde 100 µL besi ortamı içerisine ekildi. 24 saat sonra kapsaisin, beta karoten, taurin ve melatonin 1 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM konsantrasyonlarda 96 kuyucuklu plakalar içerisinde yer alan hücrelere uygulanarak 24 ve 48 saat boyunca 37°C, %5 kısmi CO2 basıncı ve nemli ortam içeren inkübatörler içerisinde inkübe edildi. Ardından her bir kuyucuğa 10 µL MTS solüsyonu ilave edildi. Plaklar MTS solüsyonu ilavesini takiben 3 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından besi ortamı uzaklaştırılarak kuyucuklara 100 µL %20'lik DMSO ilave edildi ve 20 dakika daha inkübasyona bırakıldı. Ardından ELISA mikropalak okuyucu ile (BioTek Instruments, Inc. Winooski, Vermont, ABD) 450nm'de absorbans ölçülerek değerlendirildi. Kapsaisin, beta karoten, taurin ve melatonin için her bir konsantrasyon 4 tekrarlı olarak çalışıldı. Elde edilen veriler aşağıda belirtilen formül kullanılarak her bir grup için hücre canlılığının %50 inhibe olduğu dozlar (IC50) kapsaisin, beta karoten, taurin ve melatonin uygulanmış olan hücrelerde ayrı ayrı belirlendi.

% Hücre canlılık oranı = $(A_{test} - A_{blank} / A_{kontrol} - A_{blank}) \times 100$ [12].

Wound Healing (Yara İyileşme) Testi

Yara iyileşme testi hücre etkileşimi ve migrasyonunun belirlendiği bir testtir. 12 kuyucuklu plakalara 1 ml içinde 10.000 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. 24 saat standart inkübasyondan (%5 CO2, 37°C) sonra, 200µl'lik pipet ucu ile kuyucuğun ortasından saat 12 yönünden başlayarak saat 6 yönüne düz bir çizgi çizildi. Sonrasında kuyucuklardaki vasat çekilip taze medyum ile birkaç kez yıkama yapıldı. Daha sonra hücreler belirtilen konsantrasyonlarda (1 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM) kapsaisin, beta karoten, taurin ve melatonin ile muamele edildi. Yara iyileşme oranı 0, 24 ve 48 saatlik inkübasyondan sonra ters ışık mikroskobu ile değerlendirildi [13].

Hücre Lizisi

T-75 flaksta konfluent olan hücreler tripsin-EDTA ile kaldırıldı. 6 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 1.000.000 hücre olacak şekilde ekildi ve 37°C de %5 CO2 de 24 saat inkübasyona bırakıldı. MCF-7 ve L929 hücre hatları kapsaisin, beta karoten, taurin ve melatoninin 1, 10, 25, 50, 100 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. 48 saat sonunda hücreler soğuk PBS yardımıyla kazınarak 6 kuyucuklu plakalardan kaldırıldı. PBS de süspansiyon halinde olan hücreler 4°C de 5 dk 10.000 g de santrifüj edildi. Süpernatantlar atıldı ve pellet üzerine 500 µL lizis buffer (RIPA Buffer, Abcam, #ab156034)

eklendi. 40 dakika buzda inkübe edildi. İnkübasyon sürecinde hücreler 5 dakika aralıklarla 40 dakika boyunca vortekslendi. Sonrasında tüpler 4°C'de 30 dk 10.000 g de santrifüj edildi. Süpernatantlar alındı. -20°C'de TAS ve TOS analizi için muhafaza edildi [14].

TOS Analizi

Hücre lizatının TOS analizi, ticari kitler (REL Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak yapıldı. Numunede bulunan oksidanlar, demir iyonu-şelatör kompleksini demir iyonuna oksitler. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, numunede bulunan oksidan moleküllerinin toplam miktarı ile ilgilidir. Testin kalibrasyonu için H₂O₂ kullanıldı. Sonuçlar litre başına mikromolar H₂O₂ eşdeğerine ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$) göre verildi [15].

TAS Analizi

Hücre lizatının TAS analizi, ticari kitler (REL Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak yapıldı. Antioksidanlar koyu mavi-yeşil 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS•+) radikalini renksiz indirgenmiş ABTS formuna indirger. 660 nm'de absorbans değişimi toplam antioksidan seviyesi ile ilişkilendirilmiştir. Test, Trolox eşdeğeri olarak adlandırılan stabil bir antioksidan standart solüsyonu, yani bir E vitamini analogu kullanılarak kalibre edildi [16].

Oksidatif Stres İndeksinin (OSI) Hesaplanması

Oksidatif stres indeksi, TOS seviyesinin TAS seviyesine oranı olarak tanımlandı. Spesifik olarak, OSI (arbitrary unit) = TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$)/TAS ($\mu\text{mol Trolox Eq/L}$)X100 [15].

İstatistiksel Analiz

Yara iyileşmesini analiz etmek için Imagej programı kullanıldı. Hücre canlılığı ve yara iyileşmesi % olarak ifade edildi. Tanımlayıcı veriler SPSS 22.0 paket programı (SPSS Inc., Chicago, IL, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak analiz edildi. Yara iyileşmesindeki istatistiksel farklılıklar, iki yönlü varyans analizi kullanılarak hesaplandı. IC₅₀ değerleri GraphPad Prism 8 programı kullanılarak hesaplandı. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bileşiklerin farklı dozlarda uygulanmasından sonra MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi Şekil 1'de gösterilmiştir. Tüm bileşikler, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak kanser hücre hatları üzerinde antiproliferatif etki göstermiştir. 24. saat verileri değerlendirildiğinde kapsaisin sağlıklı hücelere (181.7 μM) kıyasla MCF-7 hücre hattı üzerinde daha düşük dozda (104 μM) hücre canlılığını inhibe ettiği bulundu. Beta karotenin de sağlıklı fibroblastlara (201.2 μM) kıyasla MCF-7 hücreleri üzerinde hücre canlılığını daha düşük dozda (129.8 μM) etkilediği bulundu. Melatoninin etki dozları beta karotene benzer olarak kanser hücrelerinin (130.1 μM) hücre canlılığını sağlıklı hücelere (201 μM)

kıyasla düşük dozda etkiledi. Taurinin IC₅₀ değerleri L929 ve MCF-7 hücrelerinde sırasıyla 200.6 µM ve 118.9 µM bulundu (Tablo 1).

48. saat verileri değerlendirildiğinde kapsaisinin sağlıklı hücelere (201.3 µM) kıyasla MCF-7 hücre hattı üzerinde daha düşük dozda (137 µM) hücre canlılığını inhibe ettiği bulundu. Beta karotenin de sağlıklı fibroblastlara (200.1 µM) kıyasla MCF-7 hücreleri üzerinde hücre canlılığını daha düşük dozda (123.3 µM) etkilediği bulundu. Melatoninin etki dozları beta karotene benzer olarak kanser hücrelerinin (124.7 µM) hücre canlılığını sağlıklı hücelere (198.6 µM) kıyasla düşük dozda etkiledi. Taurinin IC₅₀ değerleri L929 ve MCF-7 hücrelerinde sırasıyla 201.7 µM ve 138.8 µM bulundu (Tablo 1).

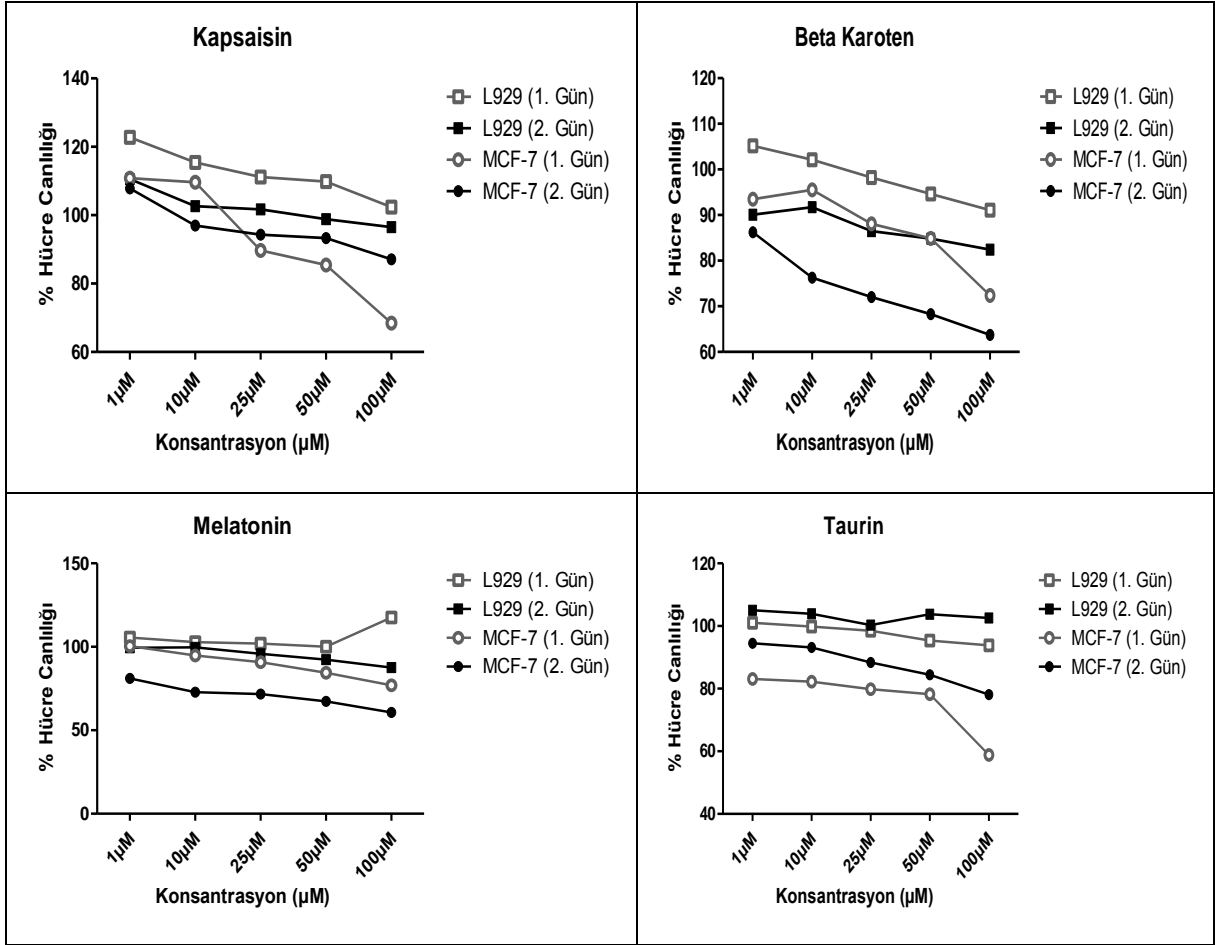
Tablo 1. Kapsaisin, beta karoten, melatonin ve taurinin sağlıklı ve kanser hücre hatlarında 24. ve 48. saatlerdeki IC₅₀ değerleri.

24. saat			48. saat		
IC ₅₀ (µM)	L929	MCF-7	IC ₅₀ (µM)	L929	MCF-7
Kapsaisin	181.7	104	Kapsaisin	201.3	137
Beta karoten	201.2	129.8	Beta karoten	200.1	123.3
Melatonin	201.0	130.1	Melatonin	198.6	124.7
Taurin	200.6	118.9	Taurin	201.7	138.8

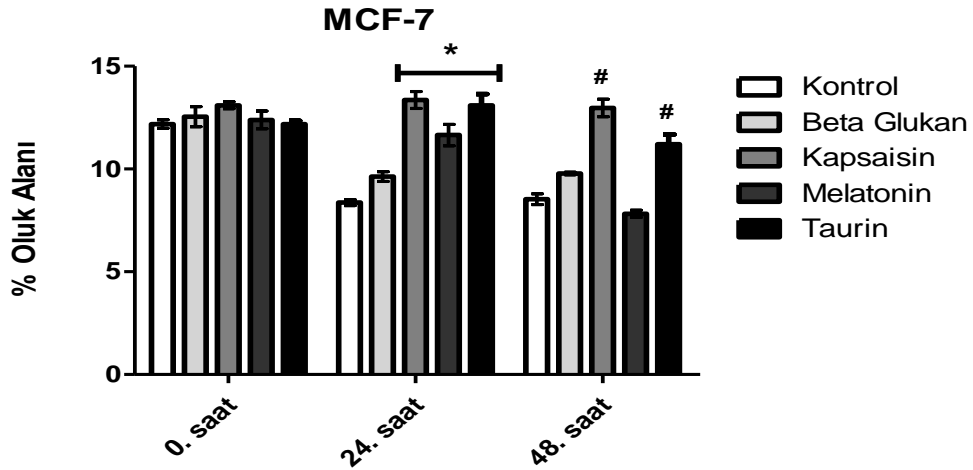
Kapsaisin, beta karoten, melatonin ve taurinin hücre göçü üzerindeki etkisini belirlemek için bir yara iyileşme deneyi yapıldı. Yara iyileşmesi sonuçlarında ilk 24 ve 48 saatte açılan yarıkların en düşük düzeyde iyileştiği ve hücrelerin migrasyon yeteneğinin kısıtlandığı görüldü. Yara kapanma alanının sonuçları, bileşiklerle tedavinin, yara kapanmasını önemli ölçüde hızlandıran hücresel göçü iyileştirdiğini göstermiştir (Şekil 2).

Sonuçlar, tüm bileşiklerin, 48 saatte MCF-7 hücre hatlarının göç kabiliyetini belirgin şekilde inhibe ettiğini gösterdi. Sağlıklı hücelere kıyasla MCF-7 hücre hattı üzerine 24. saatte kapsaisin (%159.5), beta karoten (%114.3), melatonin (%139.3) ve taurin (%155.9) oranında inhibe etmiştir. 48. saatte ise kapsaisin (%151.8), beta karoten (%115.3) ve taurin (%131.7) oranında, MCF-7 hücreleri üzerine etkili bulundu (Şekil 2).

Bileşiklerin sağlıklı hücelere kıyasla kanser hücreleri üzerindeki antioksidan aktivitesi Tablo 2'de verilmiştir. Kapsaisin sağlıklı hücelere kıyasla 10 µM dozda, beta karoten 1 µM, 10 µM, 25 µM ve 50 µM dozlarda melatonin 25 µM ve 100 µM dozlarda, taurin ise 1 µM ve 25 µM dozlarda MCF-7 hücre hattı üzerinde antioksidan aktivite göstermiştir. MCF-7 hücreleri üzerine hemen hemen tüm dozlarda antioksidan etki gösteren bileşiğin beta karoten olduğu gözlenmiştir. Beta karotenin düşük dozlarda antioksidan yüksek dozlarda prooksidan olduğunu öne süren önceki çalışmalarla [6,7] sonuçlarımız uyumlu bulunmuştur.



Şekil 1. Kapsaisin, beta karoten, melatonin ve taurinin sağlıklı ve kanser hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine etkileri.



Şekil 2. Kapsaisin, beta karoten, melatonin ve taurinin sağlıklı ve kanser hücre hatları üzerine antimigrasyon etkileri. (*: Kontrol grubuna kıyasla 24. saatte anlamlı farklılık, #: Kontrol grubuna kıyasla 48. saatte anlamlı farklılık).

Tablo 2. TOS, TAS, OSI değerleri

		L929	MCF7			L929	MCF7
Kapsaisin 1 µM	TOS	7.169	4.037	Melatonin 1 µM	TOS	0.867	6.792
	TAS	0.205	0.110		TAS	0.259	0.070
	OSI	3.497	3.670		OSI	0.334	9.702
Kapsaisin 10 µM	TOS	7.584	6.528	Melatonin 10 µM	TOS	5.207	8.679
	TAS	0.196	0.186		TAS	0.705	0.413
	OSI	3.869	3.509		OSI	0.738	2.101
Kapsaisin 25 µM	TOS	1.471	6.716	Melatonin 25 µM	TOS	8.566	4.754
	TAS	0.181	0.355		TAS	0.168	0.932
	OSI	0.813	1.891		OSI	5.099	0.510
Kapsaisin 50 µM	TOS	0.754	5.547	Melatonin 50 µM	TOS	1.433	8.566
	TAS	0.586	0.145		TAS	0.179	0.199
	OSI	0.128	3.825		OSI	0.801	4.304
Kapsaisin 100 µM	TOS	0.528	5.622	Melatonin 100 µM	TOS	15.207	7.132
	TAS	0.355	0.303		TAS	0.194	0.816
	OSI	0.149	1.855		OSI	7.838	0.874
Beta karoten 1 µM	TOS	9.132	0.188	Taurin 1 µM	TOS	12.264	0.981
	TAS	0.609	0.582		TAS	0.194	0.513
	OSI	1.499	0.032		OSI	6.321	0.191
Beta karoten 10 µM	TOS	7.358	0.981	Taurin 10 µM	TOS	3.245	12.452
	TAS	0.460	0.417		TAS	0.145	0.186
	OSI	1.599	0.235		OSI	2.237	6.694
Beta karoten 25 µM	TOS	1.207	0.830	Taurin 25 µM	TOS	4.113	10.490
	TAS	0.049	0.526		TAS	0.088	0.230
	OSI	2.463	0.157		OSI	4.673	4.560
Beta karoten 50 µM	TOS	4.981	5.698	Taurin 50 µM	TOS	5.584	10.037
	TAS	0.019	0.068		TAS	0.504	0.370
	OSI	26.215	8.379		OSI	1.107	2.712
Beta karoten 100 µM	TOS	0.603	12.339	Taurin 100 µM	TOS	6	6.641
	TAS	0.348	0.183		TAS	0.422	0.117
	OSI	0.173	6.742		OSI	1.421	5.676

Son çalışmalar, sistemik taurin düzeylerindeki değişikliklerin, belirli tümörlerin oluşumunu ve malign transformasyonunu tahmin etmek için kullanılabileceğini öne sürmüştür. Meme kanserli hastalarda serum taurin düzeyi, yüksek riskli meme kanseri grubundaki veya sağlıklı kontrol grubundaki hastalara göre önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur. Bu nedenle, taurin meme kanserinin erken teşhisi için yeni bir biyobelirteç olarak kabul edilebilir [17,10]. Taurinin, sıçanlarda dimetilbenzantrazin kaynaklı meme kanseri üzerinde engelleyici bir etki gösterdiği bulunmuştur; ayrıca taurinin kolorektal ve meme kanseri hücrelerinde apoptozu indükleyebildiği ve proliferasyonu baskılayabildiği de gösterilmiştir [18]. Okamoto ve ark. [19] kanserojen olarak dietilnitrozamin ve tümör destekleyici olarak fenobarbital ile erkek F344 sıçanlarda oluşturulan karaciğer kanserinde taurinin kimyasal kaynaklı tümör oluşumuna karşı koruyucu bir etki gösterdiğini bildirmiştir. Nude farelerde S180 ksenograft tümörleri taurin ile tedavi edildiğinde, apoptozun belirgin şekilde arttığı ve anti-apoptotik protein Bcl-

2'nin düzeyleri azalırken, pro-apoptotik protein Bax düzeylerinin arttığı gözlenmiştir [20]. Taurin ayrıca matriks metalloproteinaz-2 ekspresyonunu aşağı regüle edebilir ve N-asetil galaktosaminil transferaz 2 ekspresyonunu yukarı regüle ederek glioma hücrelerinin potansiyel istilasını ve metastazını baskılayabilir [21].

Yapılan çalışmalar, acı biber tüketiminin insanlarda kanser riskini artırabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, diğer araştırmacılar, kapsaisinin, apoptotik indüksiyon yoluyla ölümsüzleştirilmiş veya habis hücrelerin büyümesini inhibe etme üzerindeki *in vitro* etkisini göstererek, kapsaisinin antikanserojenik ve anti-mutajenik aktivitelere sahip olduğunu göstermektedirler [22,23]. Ancak normal hücrelerde kapsaisin büyük ölçüde etkisizdir [24]. Kapsaisinin insan meme kanseri MCF-7 hücrelerinde kaspaz-3'ü içermeyen kaspaz bağımlı bir yol aracılığıyla apoptozu indüklediği gösterilmiştir [4]. Bununla birlikte, şu anda insan meme kanseri hücrelerinde kaspazdan bağımsız yol ile kapsaisin kaynaklı apoptoz arasındaki ilişki hakkında net bir bilgi bulunmamaktadır. Doğal polifenollerin sağlık üzerinde faydalı etkileri olduğu bilinmektedir. Bu bileşikler, antioksidan aktivitelerinden dolayı araştırmalara konu olmuştur. Antioksidan aktivitesine ek olarak, kapsaisin MCF-7 hücrelerinde ROS (reaktif oksijen türleri) üretimi olmaksızın mitokondriyal yol aracılığıyla da apoptozu indüklemektedir [25]. Düşük dozlarda kapsaisinin toksisitesi minimumdur. Bununla birlikte, kapsaisinin biyotransformasyonla mutajenik veya kanserojen bir forma dönüştüğü öne sürülmüştür. Kapsaisinin toksisitesini açıklamak için birkaç metabolik mekanizma araştırılmıştır. Bunlar arasında elektrofilik epoksit üretimi, bir fenoksi radikali veya O-demetilasyon ve semikinon ve kinon türevleri üretmek için oksidasyon sayılabilir [26]. Kapsaisin, deneysel karsinogenez ve mutajenez üzerindeki etkileri nedeniyle birçok araştırmacı tarafından test edilmiştir. Literatürdeki veriler, kapsaisinin kanserojenik ve mutajenik süreçler üzerinde ikili etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Şu anda, deney hayvanları ile yapılan erken araştırmaların sonuçları, bu bileşiğin orta derecede tümörjenitesini göstermesine rağmen, kırmızı ve acı biberlerin veya bunların başlıca keskin içerikli içeriği olan kapsaisinin insanlarda kanserojen olduğuna dair sağlam bir kanıt yoktur. Buna karşılık, son çalışmalar kapsaisinin önemli antijenotoksik ve antikanserojenik etkilerini ortaya koymaktadır. Bu bileşiğin potansiyel bir kemopreventif aktiviteye sahip bir başka önemli diyet fitokimyasalı olduğunu düşündürmektedir. Kapsaisin sinir, kardiyovasküler, solunum, termoregülatuar ve gastrointestinal sistemler üzerinde etkilere sahiptir. Duyusal sinir iletimini incelemek için bir nörokimyasal araç olarak kullanılmıştır. *In vitro* ve hayvan çalışmalarında kapsaisin infüzyonunun (200 mg/kg, intravenöz yolla) pentobarbiton ile anestezi uygulanmış sıçanların adrenal medullasında doza bağlı katekolamin salgısını (adrenalin, noradrenalin) uyardığı bildirilmiştir. Kapsaisin meme kanseri hücrelerine karşı belirgin antiproliferatif etkiler göstermektedir. Kapsaisin, östrojen reseptörü (ER)-pozitif (MCF-7, T47D, BT-474) ve ER-negatif (SK-BR-3, MDA-MB-231) meme kanseri hücre hatlarının büyümesini inhibe etmektedir [27].

In vitro deneylerde, düşük dozlarda beta karotenin insan vücudunda antioksidan ve antiinflamatuvar özellikler sergilediği, yüksek dozlarda ise kanser hücrelerinde, pro-oksidan ve proinflamatuvar etkiler gösterdiği bulunmuştur. Çalışmalar ayrıca, daha yüksek konsantrasyonlarda beta karotenin, hücre sinyalizasyonu için gerekli olan canlı sistemlerde oksidasyon ve antioksidasyon arasındaki dengeyi değiştirebileceğini göstermiştir [28]. Spesifik karotenoidlerin meme kanserine karşı koruyucu bir faktör olarak hareket edebileceği ile ilişkili birkaç mekanizma vardır. Bağışıklık fonksiyonunun güçlendirilmesi, hücrelerin DNA hasarına karşı korunması, hücrelerarası iletişimin uyarılması, detoksifiye edici enzimlerin indüklenmesi ve hücresel proliferasyonun inhibisyonu üzerindeki genel etkilerinin yanı sıra, ayrıca spesifik aktiviteleri olduğu da gösterilmiştir [29]. Beta karoten, nükleer transkripsiyon faktör kappa B (NF-Kb)'nın redoks regülasyonu yoluyla kanser hücrelerinde büyüme-inhibitör ve pro-apoptotik etkileri kontrol edebilir [30]. Bazı çalışmalar, karotenoid alımı ile meme kanseri riski arasındaki ilişkinin östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) durumuna göre sınıflandırıldığını bildirmiştir [31]. Yapılan bir çalışmada diyetle α -karoten, β -karoten ve lutein/zeaksantin alımının ER(-) meme kanseri riskini düşürdüğü, ancak ER(+) meme kanseri riski ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir [32].

Melatonin, N-asetil-5-metoksitriptamin, epifiz bezi, deri, kemik iliği ve retina gibi çeşitli organlarda üretilen bir hormondur. Melatonin sirkadiyen ritim düzenlemesi, mevsimsel değişimler, uyku periyodu, üreme ve kardiyovasküler fonksiyonlar gibi çeşitli fizyolojik süreçleri içerir [33]. Melatonin ayrıca bağışıklık ve hematopoetik sistemleri de düzenler. Melatoninin meme karsinogenezinde onkostatik ve antiproliferatif etkileri olduğu ve ayrıca MCF-7 hücrelerinde p53 ve p21 ekspresyonunu artırarak apoptotik yolu indüklediği bildirilmiştir [34]. Melatonin, aracı metabolizma ve kanserin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. MCF-7 hücrelerinde melatonin ve retinoik asidin birlikte kullanımının, TGF β 1 (dönüştürücü büyüme faktörü β 1) ve Bcl2'nin azalmış ekspresyonu ile tutarlı bir şekilde RARa'nın (retinoik asit reseptörü) aktivasyonu yoluyla MCF-7 meme kanseri hücrelerinde apoptozu teşvik edebildiği ve pro-apoptotik protein Bax'ın ekspresyonunu arttırdığı bulunmuştur [11]. Melatonin ve retinoik asidin birlikte uygulanmasının, sıçanlarda NMU (N-nitroso-N-metilüre) ile indüklenen meme tümörlerinin gelişimini %90'ın üzerinde bir oranda inhibe edebildiği gösterilmiştir [35]. İnsan neoplazmalarında bir adjuvan olarak melatoninin değerini değerlendirmek için çeşitli klinik deneyler yapılmış ve kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanıldığında melatoninin birçok yararlı etkisi ortaya çıkmıştır. Kemoterapinin, kanser hastalarına melatonin ile birlikte uygulandığında daha iyi tolere edildiği gözlenmiştir [36].

Bu çalışmamızda metastatik olmayan MCF-7 meme kanseri hücre hattının ve L929 sağlıklı fibroblast hücre hattının kapsaisin, beta karoten, melatonin ve taurin ile muamelesi sonucunda hücre canlılığında, hücre migrasyonunda ve antioksidan/oksidan seviyelerinde meydana gelen değişiklikler incelenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda yapılan uygulamaların neticesinde bileşiklerin kanser hücre

hattında sağlıklı hücre hattına kıyasla hücre canlılığını daha düşük dozlarda azalttıkları tespit edilmiştir. Yara iyileşmesi üzerindeki etkileri incelendiğinde ilk 24 ve 48 saatte açılan yarıkların en düşük düzeyde iyileştiği ve hücrelerin migrasyon yeteneğinin kısıtlandığı görülmüştür. Sonuçlar, kapsaisin, beta karoten, melatonin ve taurin ile muamelenin, yara kapanmasını önemli ölçüde hızlandıran hücresel göçü iyileştirdiğini göstermiştir. Tüm bileşiklerin farklı dozlarda antioksidan aktivite gösterdiği ancak, MCF-7 hücreleri üzerine hemen hemen tüm dozlarda antioksidan etki gösteren bileşiğin beta karoten olduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçların yeni ve farklı kombinasyon denemeleri yapılması açısından literatüre değerli ve önemli bilgiler sağlayacağı düşünülmektedir.

YAZARLARIN KATKISI

Kavram: S.Ü., N.B.T.; Tasarım: H.Y., N.B.T.; Denetim: S.Ü., N.B.T.; Kaynaklar: S.Ü.; Malzemeler: H.Y., D.A.Ö.; Veri Toplama ve/veya işleme: H.Y., D.A.Ö., N.B.T.; Analiz ve/veya yorumlama: D.A.Ö., S.Ü.; Literatür taraması: S.Ü.; Makalenin yazılması: S.Ü., H.Y.; Kritik inceleme: S.Ü., N.B.T.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

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

ETİK KURUL ONAYI

Yazarlar bu çalışma için etik kurul onayının zorunlu olmadığını beyan etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Ginsburg, O., Bray, F., Coleman, M. P., Vanderpuye, V., Eniu, A., Kotha, S. R., Sarker, M., Huong, T. T., Allemani, C., Dvaladze, A., Gralow, J., Yeates, K., Taylor, C., Oomman, N., Krishnan, S., Sullivan, R., Kombe, D., Blas, M.M., Parham, G., Kassami, N., Conteh, L. (2017). The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health. *Lancet (London, England)*, 389(10071), 847–860. [CrossRef]
2. Schirmacher, V. (2019). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *International Journal of Oncology*, 54, 407-419.
3. Wang, H., Khor, T.O., Shu, L., Su, Z.Y., Fuentes, F., Lee, J.H., Kong, A.N. (2012). Plants vs. cancer: a review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 12(10), 1281–1305. [CrossRef]

4. Chou, C.C., Wu, Y.C., Wang, Y.F., Chou, M.J., Kuo, S.J., Chen, D.R. (2009). Capsaicin-induced apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through caspase-independent pathway. *Oncology Reports*, 21(3), 665–671. [\[CrossRef\]](#)
5. Eghdami, A., Salehi, M.A., Babakhani, M. (2014). Determination of physicochemical properties of capsaicin and cytotoxic effect of capsicum extract in breast cancer (MCF7) cell line. *International Journal of Biosciences*, 4(8), 262-268.
6. Sowmya, S.G., Yogendra, P.K., Arpitha, H.S., Deepika, U.R., Nawneet, K.K., Mondal, P., Ganesan, P. (2017). β -carotene at physiologically attainable concentration induces apoptosis and down-regulates cell survival and antioxidant markers in human breast cancer (MCF-7) cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 436(1-2), 1-12. [\[CrossRef\]](#)
7. Yeh, S.L., Wang, H.M., Chen, P.Y., Wu, T.C. (2009). Interactions of b-carotene and flavonoids on the secretion of pro-inflammatory mediators in an in vitro system. *Chemico-Biological Interactions*, 179(2-3), 386-393. [\[CrossRef\]](#)
8. Gloria, N.F., Soares, N., Brand, C., Oliveira, F.L., Borojevic, R., Teodoro, A.J. (2014). Lycopene and beta-carotene induce cell-cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cell lines. *Anticancer Research*, 34(3), 1377-1386. [\[CrossRef\]](#)
9. Zhang, X., Lu, H., Wang, Y., Liu, C., Zhu, W., Zheng, S., Wan, F. (2015). Taurine induces the apoptosis of breast cancer cells by regulating apoptosis-related proteins of mitochondria. *International Journal of Molecular Medicine*, 35(1), 218–226. [\[CrossRef\]](#)
10. Tu, S., Zhang, X.L., Wan, H.F., Xia, Y.Q., Liu, Z.Q., Yang, X.H., Wan, F.S. (2018). Effect of taurine on cell proliferation and apoptosis human lung cancer A549 cells. *Oncology Letters*, 15(4), 5473–5480. [\[CrossRef\]](#)
11. Gatti, G., Lucini, V., Dugnani, S., Calastretti, A., Spadoni, G., Bedini, A., Rivara, S., Mor, M., Canti, G., Scaglione, F., Bevilacqua, A. (2017). Antiproliferative and pro-apoptotic activity of melatonin analogues on melanoma and breast cancer cells. *Oncotarget*, 8(40), 68338–68353. [\[CrossRef\]](#)
12. Barltrop, J.A., Owen, T.C., Cory, A.H., Cory, J.G. (1991). 5-(3- carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3- (4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, 1(11), 611-614. [\[CrossRef\]](#)
13. Liang, C.C., Park, A., Guan, J.L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, 2(2), 329–333. [\[CrossRef\]](#)
14. Ammerman, N.C., Beier-Sexton, M., Azad, A.F. (2008). Growth and maintenance of Vero cell lines. *Current protocols in microbiology*, Appendix 4, Appendix–4E. [\[CrossRef\]](#)
15. Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38(12), 1103–1111. [\[CrossRef\]](#)
16. 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. [\[CrossRef\]](#)

17. El Agouza, I.M., Eissa, S.S., El Houseini, M.M., El-Nashar, D.E., Abd El Hameed, O.M. (2011). Taurine: A novel tumor marker for enhanced detection of breast cancer among female patients. *Angiogenesis*, 14(3), 321–330. [\[CrossRef\]](#)
18. Zhang, X., Lu, H., Wang, Y., Liu, C., Zhu, W., Zheng, S., Wan, F. (2015). Taurine induces apoptosis of breast cancer cells by regulating apoptosis-related proteins of mitochondria. *International Journal of Molecular Medicine*, 35(1), 218–226. [\[CrossRef\]](#)
19. Okamoto, K., Sugie, S., Ohnishi, M., Makita, H., Kawamori, T., Watanabe, T., Tanaka, T., Mori, H. (1996). Chemopreventive effects of taurine on diethylnitrosamine and phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. *Japanese Journal of Cancer Research*, 87(1), 30–36. [\[CrossRef\]](#)
20. Wang, H.R. (2008). PhD Thesis. Experimental study of the effect of taurine on sarcoma 180(S180) in mices. Qingdao University, Qingdao, China.
21. Neary, P.M., Hallihan, P., Wang, J.H., Pfirrmann, R.W., Bouchier-Hayes, D.J., Redmond, H.P. (2010). The evolving role of taurolidine in cancer therapy. *Annals of Surgical Oncology*, 17(4), 1135–1143. [\[CrossRef\]](#)
22. Popescu, G.D.A., Scheau, C., Badarau, I.A., Dumitrache, M.D., Caruntu, A., Scheau, A.E., Costache, D.O., Costache, R.S., Constantin, C., Neagu, M., Caruntu, C. (2020). The effects of capsaicin on gastrointestinal cancers. *Molecules*, 26(1), 94. [\[CrossRef\]](#)
23. Zhang, R., Humphreys, I., Sahu, R.P., Shi, Y., Srivastava, S.K. (2008). In vitro and in vivo induction of apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death pathway. *Apoptosis*, 13(12), 1465-1478. [\[CrossRef\]](#)
24. Popescu, G., Scheau, C., Badarau, I. A., Dumitrache, M. D., Caruntu, A., Scheau, A. E., Costache, D. O., Costache, R. S., Constantin, C., Neagu, M., Caruntu, C. (2020). The Effects of Capsaicin on Gastrointestinal Cancers. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(1), 94. [\[CrossRef\]](#)
25. Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., Mattei, J. (2018). The role of polyphenols in human health and food systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition*, 5, 87. [\[CrossRef\]](#)
26. Surh, Y.J., Lee, S.S. (1995). Capsaicin, a double-edged sword: toxicity, metabolism, and chemopreventive potential. *Life Sciences*, 56(22), 1845–1855. [\[CrossRef\]](#)
27. Fattori, V., Hohmann, M.S., Rossaneis, A.C., Pinho-Ribeiro, F.A., Verri, W.A. (2016). Capsaicin: Current understanding of its mechanisms and therapy of pain and other pre-clinical and clinical uses. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(7), 844. [\[CrossRef\]](#)
28. Bouayed, J., Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants--Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), 228–237. [\[CrossRef\]](#)
29. Cooper, D.A., Eldridge, A.L., Peters, J.C. (1999). Dietary carotenoids and certain cancers, heart disease, and age-related macular degeneration: a review of recent research. *Nutrition Reviews*, 57(7), 201–214. [\[CrossRef\]](#)
30. Hirsch, K., Atzmon, A., Danilenko, M., Levy, J., Sharoni, Y. (2007). Lycopene and other carotenoids inhibit estrogenic activity of 17beta-estradiol and genistein in cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 104(2), 221–230. [\[CrossRef\]](#)

31. Larsson, S.C., Bergkvist, L., Wolk, A. (2010). Dietary carotenoids and risk of hormone receptor-defined breast cancer in a prospective cohort of Swedish women. *European Journal of Cancer*, 46(6), 1079–1085. [\[CrossRef\]](#)
32. Zhang, X., Spiegelman, D., Baglietto, L., Bernstein, L., Boggs, D.A., van den Brandt, P.A., Buring, J.E., Gapstur, S.M., Giles, G.G., Giovannucci, E., Goodman, G., Hankinson, S.E., Helzlsouer, K.J., Horn-Ross, P.L., Inoue, M., Jung, S., Khudyakov, P., Larsson, S.C., Lof, M., McCullough, M.L., Miller, B.A., Neuhauser, M.L., Palmer, J.R., Park, Y., Robien, K., Rohan, T.E., Ross, J.A., Schouten, L.J., Shikany, J.M., Tsugane, S., Visvanathan, K., Weiderpass, E., Wolk, A., Willett, W.C., Zhang, S.M., Ziegler, R.G., Smith-Warner, S.A. (2012). Carotenoid intakes and risk of breast cancer defined by estrogen receptor and progesterone receptor status: a pooled analysis of 18 prospective cohort studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95(3), 713–725. [\[CrossRef\]](#)
33. Tordjman, S., Chokron, S., Delorme, R., Charrier, A., Bellissant, E., Jaafari, N., Fougerou, C. (2017). Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Current Neuropharmacology*, 15(3), 434-443.
34. Menéndez-Menéndez, J., Martínez-Campa, C. (2018). Melatonin: An anti-tumor agent in hormone-dependent cancers. *International Journal of Endocrinology*, 3271948. [\[CrossRef\]](#)
35. Nowfar, S., Teplitzky, S.R., Melancon, K., Kiefer, T.L., Cheng, Q., Dwived, P.D., Bischoff, E.D., Moro, K., Anderson, M.B., Dai, J., Lai, L., Yuan, L., Hill, S.M. (2002). Tumor prevention by 9-cis-retinoic acid in the N-nitroso-N-methylurea model of mammary carcinogenesis is potentiated by the pineal hormone melatonin. *Breast Cancer Research and Treatment*, 72(1), 33-43. [\[CrossRef\]](#)
36. Najafi, M., Salehi, E., Farhood, B., Nashtaei, M.S., Hashemi Goradel, N., Khanlarkhani, N., Namjoo, Z., Mortezaee, K. (2019). Adjuvant chemotherapy with melatonin for targeting human cancers: A review. *Journal of Cellular Physiology*, 234(3), 2356–2372. [\[CrossRef\]](#)



RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE (RDRP) INHIBITOR DRUGS AGAINST SARS-COV-2: A MOLECULAR DOCKING STUDY

SARS-COV-2'YE KARŞI RNA-BAĞIMLI RNA POLİMERAZ (RDRP) İNHİBİTÖR İLAÇLARI:
BİR MOLEKÜLER DOCKİNG ÇALIŞMASI

Sarah GADO¹ , Zeynep ATES ALAGOZ^{1*} 

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

ABSTRACT

Objective: SARS-CoV-2 associated viral pandemic was first reported in Wuhan, China, in December 2019. Due to the rapid increase in its pathogenicity, SARS-CoV-2 was declared a global pandemic by WHO on March 11, 2020. For that reason, determining the most attractive viral protein targets became a must. One of the most important target proteins is SARS-COV-2 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) on which COVID-19 depends in its replication process. This study aimed to examine the possible interactions between RdRp and the most promising RdRp nucleoside inhibitors especially Purine nucleoside analogs, to detect the most important residues that commonly interact with RdRp's inhibitors and to investigate whether if there any mutations have been observed so far in these residues or not.

Material and Method: Molecular docking studies were carried out using AutoDock Vina between SARS-CoV-2 RdRp and drugs approved against different viral RdRps (Galidesivir, Remdesivir, Ribavirin, Sofosbuvir, and Favipiravir) as well as physiological nucleotides (ATP and GTP). Based on the obtained results, a detailed surface-interaction analysis was also performed using Pymol and Discovery Studio Visualizer software for the models that exhibited the most suitable location and configuration in space.

Result and Discussion: All the tested molecules were able to bind to SARS-CoV-2 RdRp successfully. Also, they all commonly interact with 9 different amino acids (Arg553, Arg555, Asp618, Asp623, Ser682, Asn691, Ser759, Asp760, and Asp761), and 3 different Template-primer RNA nucleotides (U10, A11, and U20) causing inhibition of viral RdRp via non obligate RNA chain termination.

Keywords: COVID-19, molecular docking, RdRp, nucleotide analogs

ÖZ

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Zeynep Ates Alagoz
e-posta / e-mail: zates@pharmacy.ankara.edu.tr, **Tel./ Phone:** +903122033078

Amaç: SARS-CoV-2 ile ilişkili viral pandemisi ilk olarak Aralık 2019'da Çin'in Wuhan kentinde bildirilmiştir. enfeksiyon gücünün yüksek olması nedeniyle, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 11 Mart 2020 tarihinde SARS-CoV-2'yi küresel pandemi olarak ilan etmiştir. Bu nedenle en önemli viral protein hedeflerinin belirlenmesi bir zorunluluk haline geldi. En önemli hedef proteinlerden biri ise, SARS-COV-2'nin replikasyon sürecinin bağlı olduğu RNA'ya bağımlı RNA polimerazdır (RdRp). Bu çalışmada RdRp ile RdRp nükleozit inhibitörleri, özellikle de Purin nükleozid analogları arasındaki olası etkileşimlerin incelenmesi, RdRp inhibitörleri ile yaygın olarak etkileşime giren en önemli kalıntıların saptanması ve bu kalıntılarda şimdiye kadar herhangi bir mutasyon gözlemlenip gözlemlenmediği araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: SARS-CoV-2 RdRp'ye karşı fizyolojik nükleotidler (ATP ve GTP) ve farklı viral RdRpler'e karşı onaylanmış ilaçlar (Galidesivir, Remdesivir, Ribavirin, Sofosbuvir ve Favipiravir) olmak üzere toplam 7 bileşik test edilmiştir. RdRp ile bu 7 bileşik arasında AutoDock Vina yardımıyla moleküler docking çalışmaları gerçekleştirilmiş olup moleküler docking çalışmalarından elde edilen sonuçlara ve uzaydaki konfigürasyonlarına göre en uygun olan modelleri için de detaylı yüzey etkileşim analizi Pymol ve Discovery Studio Visualizer software yardımıyla yapılmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Test edilen tüm moleküller, SARS-CoV-2 RdRp'ye başarıyla bağlanabilmiştir. Ayrıca hepsi 9 farklı amino asit ile (Arg553, Arg555, Asp618, Asp623, Ser682, Asn691, Ser759, Asp760 ve Asp761) aynı zamanda 3 farklı Template-primer RNA nükleotidi (U10, A11 ve U20) ile etkileşime girmiş ve zorunlu olmayan RNA zinciri sonlandırması yoluyla viral RdRp'nin inhibisyonuna neden olmuşlardır.

Anahtar Kelimeler: COVID-19, moleküler docking, RdRp, nükleotid analogları

INTRODUCTION

Viral infectious diseases continue to be a serious problem for human health. The global SARS-CoV-2 associated viral pneumonia pandemic was first reported in Wuhan, China, in December 2019 [1]. Later then, SARS-CoV-2 was declared as a global pandemic by WHO on March 11, 2020, due to the rapid increase in its pathogenicity and rate of transmission. According to the WHO (COVID-19) Dashboard, as of 24 September 2021, a total of 230,418,451 confirmed cases of COVID-19 have been reported worldwide, including 4,724,876 deaths (<https://covid19.who.int>). This massive loss of population worldwide due to the SARS-CoV-2 pandemic has raised the urgent call for antiviral drugs for treatment/prevention against COVID-19. This study includes information about the biochemical structure of COVID-19 and its most important proteins that represent strategic targets to reveal the best treatment possibilities for coronavirus. As we aimed to examine in detail the biochemical structures of RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), one of the most important proteins that COVID-19 depends on in its replication process, and its physiological nucleotide (ATP and GTP) as well as the most promising RdRp inhibitors such as Galidesivir, Remdesivir, Ribavirin, Sofosbuvir, and Favipiravir. Also, molecular docking studies and detailed surface interaction analysis were carried out between RdRp and these approved drugs, in the hope of making a little academic contribution to our heavy fight against COVID-19.

The new novel coronavirus belongs to the beta genus of coronavirus, which is non-segmented, enveloped, positive-sense, and single-stranded RNA viruses commonly found in mammals [2, 3]. SARS-CoV-2, as a positive-sense, single-stranded RNA virus, is capable of synthesizing a full-length negative-sense RNA strand that serves as a template for further production of Positive genomic RNA (gRNA) and subgenomic RNAs (sgRNAs) [4]. RNA viruses' hardship appears in their evolutionary

capacity, exhibiting high mutation rates and frequent recombination [5]. The mechanisms of host shifting have been closely studied in emerging zoonotic viruses such as influenza virus, Hepatitis C virus, Ebola virus, (SARS-CoVs) [6]. SARS-CoV-2 has a unique survival strategy to balance viral replication with viral spread. In addition, COVID-19 exhibited an immunomodulatory profile that overstimulated the innate immune response and over suppressed the adaptive immune response [7]. In the disease caused by SARS-CoV-2, appears a clinical profile ranging from asymptomatic to severe respiratory failure, and the main symptoms of infection are cold, fever, pneumonia, cough, bronchiolitis with occasional diarrhea [8].

The SARS-CoV-2 genome is nearly 30 kb and encodes 29 proteins at least, including 4 structural proteins, 16 nonstructural proteins (NSPs), and 9 accessory proteins. On cell entry, the genomic RNA of SARS-CoV-2 is translated from two open reading frames ORF1a and ORF1b, to produce two overlapping polyproteins, pp1a and pp1ab, respectively. pp1ab is then cleaved into 16 NSPs by the viral proteases NSP3 and NSP5 [4]. While ORFs at the 3' end encode four structural proteins and nine putative accessory factors [9]. Structural proteins are involved in the assembly of the virion and the pathogenesis of infection. Structural proteins are classified as follows: Envelope protein (E), Nucleocapsid protein (N), Membrane proteins (M), and Spike glycoprotein (S) [10]. S-glycoprotein of SARS-CoV-2 initiates infection by binding to the host cell Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor to initiate viral entry as S-glycoprotein undergoes proteolytic cleavages by host proteases (such as Trypsin and Furin) [11]. Knowing the structural and functional properties of the SARS-CoV-2 main proteins will help the development of viral-specific drug treatments and vaccines.

Molecules targeted by specific antiviral agents must be required for the viral life cycle or immune clearance. Such molecules can be divided into two categories: viral molecules and host molecules necessary for the completion of virus replication [12]. COVID-19 Spike structural protein, as well as multiple nonstructural proteins that also function as viral enzymes such as RdRP (nsp12), 3CL protease (nsp5), papain-like protease (nsp3), and helicase (nsp13), play essential roles for viral entry into the host cell and intracellular replication. They are also considered important targets for antiviral development due to the absence of closely related host cell counterparts [9]. A key component, RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), also known as nsp12, catalyzes viral RNA synthesis and thus plays a crucial role in the replication and transcription cycle of the COVID-19 virus [13].

Biochemical Structure of RNA-dependent RNA Polymerase (RDRP)

Nsp12 is the catalytic subunit and core component of CoVs RdRp. Nsp12 forms a complex with two cofactor proteins (nsp7 and nsp8) and participates in the RNA template-dependent synthesis of viral RNA in the presence of divalent metal ions. The binding of nsp12 to nsp7 and nsp8 enhances the binding processability of nsp12 to RNA template [14]. NSP12 has three domains, the RdRp domain (367–920 aa), the NiRAN domain (4–28 aa and 69–249 aa), and the interface domain (250–365 aa). The RdRp

domain consists of three subdomains: the (Finger) subdomain (366–581 and 621–679 aa), the (Palm) subdomain (582–620 and 680–815 aa), and the (Thumb) subdomain (816–920 aa) [4] (Fig.1). An additional N-terminal β -Hairpin (residues Asp29 to Lys50) generated by a prominent CYRO-EM map is inserted into the groove compressed by the NiRAN domain and the Palm subdomain in the RdRp domain [13]. The nsp7-nsp8 pair shows a conserved structure similar to the SARS-CoV nsp7-nsp8 pair [15]. Unless that, The orientation of the N-terminal helix of the individual nsp8 monomer attached to Nsp12 is shifted in comparison with that of the nsp7-nsp8 pair [13] (Fig. 1).

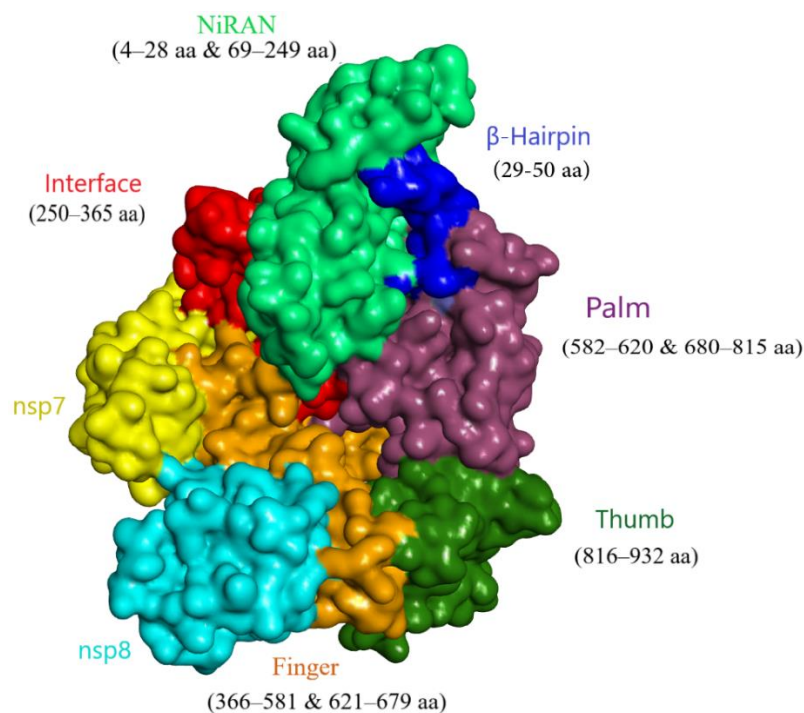


Figure 1. Structure of Nsp12 (RdRp)-Nsp7-Nsp8 complex of COVID-19

The cryo-electron microscopy structure of SARS-CoV-2 RdRp (PDB ID: 6M71) consisting of the Nsp12-nsp7-nsp8 complex is shown. Here, nsp7, nsp8-1 nsp8-2, Fingers domain, Thumb domain, Palm domain, NiRAN domain, β -Hairpin, and interface domain are shown in yellow, light blue, orange, dark green, purple, light green, blue, and red colors, respectively. The structure demonstration was made with the Discovery Studio Visualizer software.

With the accumulation of increasing knowledge about the disease and treatment experience, diagnostic and treatment programs for COVID-19 are constantly updated. Notably, antiviral drugs, antibiotics, antiprotozoal drugs, fusion inhibitors, immunomodulatory and anti-inflammatory drugs are the drug categories commonly used [16]. An efficient approach to boost drug discovery is to examine whether currently approved antiviral drugs are effective in treating COVID-19 or not [17]. The antiviral chemotherapeutic treatment concept usually relies on targeting specific viral enzymes or attacking a weak point of viral replication, such as targeting different RdRps [18]. Especially when the RdRp

inhibition process is not expected to cause target-related side effects. The availability of antiviral drugs specific to SARS-CoV-2 will be an urgent need in parallel with preventive vaccines.

RNA-dependent RNA Polymerase (RdRp) Inhibitors

One of the major strategies used in the RdRp enzyme inhibition process is the use of nucleotide triphosphate analogs which prevent the binding of natural substrates through steric exclusion [19]. Nucleoside inhibitors are generally metabolized inside cells to their corresponding triphosphate forms then bound to the active site of viral polymerases, for that reason, they are called Active site ligands [20]. There are two known classes of RdRp inhibitors: nucleoside analog inhibitors (NIs) and non-nucleoside analog inhibitors (NNIs). As this study aimed to focus on nucleoside inhibitors, NIs terminate the RNA synthesis step, which is essential for RNA replication, through their incorporation by RdRp, which prevents incoming nucleotides from being added to the RNA chain [21]. Because of this mechanism, NIs are mostly called chain termination inhibitors (Fig. 2).

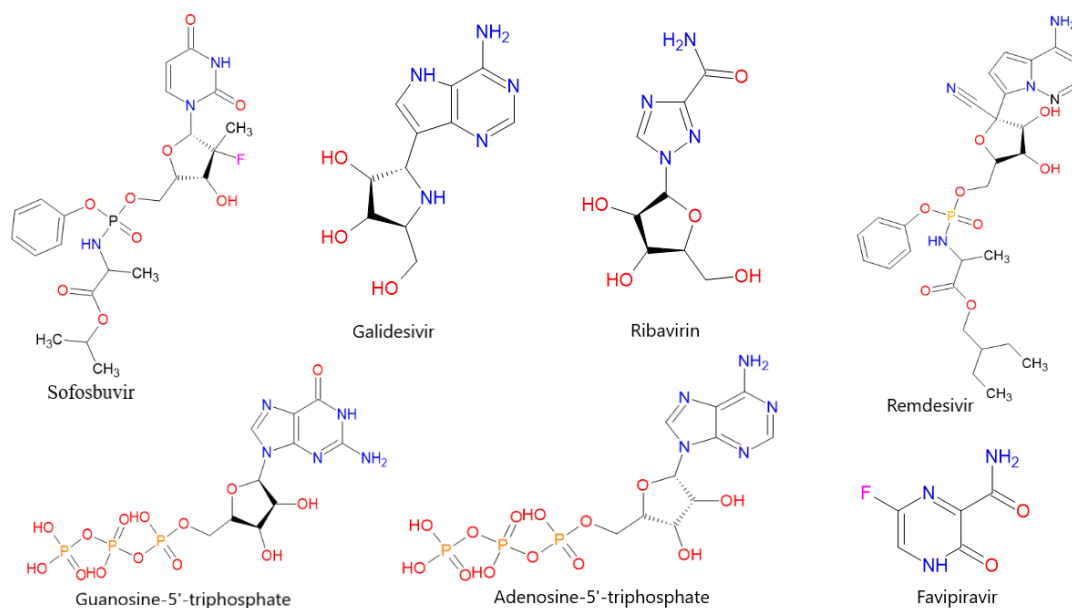


Figure 2. The chemical structure of the physiological nucleotides (ATP and GTP) and the five purine nucleoside inhibitor drugs approved against different viral RdRps (Galidesivir, Remdesivir, Ribavirin, Sofosbuvir, and Favipiravir)

MATERIAL AND METHOD

To examine the dissolved crystal structure of SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and to use it in docking trials, an electron microscopy crystallographic structure of SARS-CoV-2 nsp12 in complex with its cofactors (nsp7 and nsp8) and Remdesivir-TP as an inhibitor (PDB ID: 7BV2 2.5 Å), was retrieved from Protein Data Bank (www.rcsb.org) and was selected to be the target

protein in the docking processes. And for protein preparation Chimera and Autodock 4 programs were used.

Before testing the ligands against SARS-CoV-2 RdRp, the structures of the ligands were ensured to be in the active (triphosphate) form. Pymol software was used to build up the Remdesivir triphosphate, Galidesivir triphosphate, and Sofosbuvir triphosphate molecules from their monophosphate molecules retrieved from Pubchem. However, other ligands were directly retrieved from the PubChem web server.

For performing molecular docking, AutoDock Vina software was used in all of the docking trials, in which the SARS-CoV-2 RdRp was treated as a rigid protein target, and the ligands were flexible. After molecular docking processes, the obtained models were analyzed using Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) web server, Pymol, and Discovery Studio Visualizer.

RESULT AND DISCUSSION

To examine the dissolved crystal structure of SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), an electron microscopy crystallographic structure of SARS-CoV-2 nsp12 in complex with its cofactors (nsp7 and nsp8), and Remdesivir-TP as an inhibitor (PDB ID: 7BV2 2.5 Å) was retrieved from Protein Data Bank and was selected to be the target protein in all docking processes. This protein consists of A chain (represents nsp12), B chain (represents nsp8), C chain (represents nsp7), T chain, and P chain (represent Template - Primer RNA), 2 Zn ions and 2 Mg ions. To get the target protein prepared for the docking process, Chimera software was used to replace any incomplete side chains using the Dunbrack 2010 Rotamer Library. Then Autodock4 Tools software was used to delete water molecules, add polar hydrogen, and calculate Kollman charges (16.001). After the protein preparation process, the validity of the target protein (1011 residues) was mediated by the Ramachandran plot (100% of the residues in the allowed regions, 92.7% in the most favored region, and %6.7 of the residues in additional allowed regions).

Before testing the ligands against SARS-CoV-2 RdRp, the structures of the ligands were ensured to be in the active (triphosphate) form. Pymol software was used to build up the Remdesivir triphosphate, Galidesivir triphosphate, and Sofosbuvir triphosphate molecules from their monophosphate molecules retrieved from Pubchem. However, other ligands were directly retrieved from the PubChem web server.

After the preparation of Ligands and target Protein, a literature search was carried out to identify key residues known to interact with Remdesivir triphosphate to determine the active site for the correct positioning of the Grid box. In addition, the original ligand (Remdesivir-TP) in the crystal structure of the target protein was used as a leader ligand for determining the active site. Then, AutoDock 4 Tools program was used for generating a Grid box of (30 Å × 30 Å × 30 Å) positioned in (97.791, 95.583, 102.373) (Fig. 3).

For performing molecular docking, AutoDock Vina software was used in all of the docking trials

in which the SARS-CoV-2 RdRp was treated as a rigid protein target and the ligands were flexible. 7 Compounds were tested against SARS-CoV-2 RdRp. Namely, the physiological nucleotides (ATP and GTP), and five purine nucleoside inhibitor drugs approved against different viral RdRps (Galidesivir, Remdesivir, Ribavirin, Sofosbuvir, and Favipiravir).

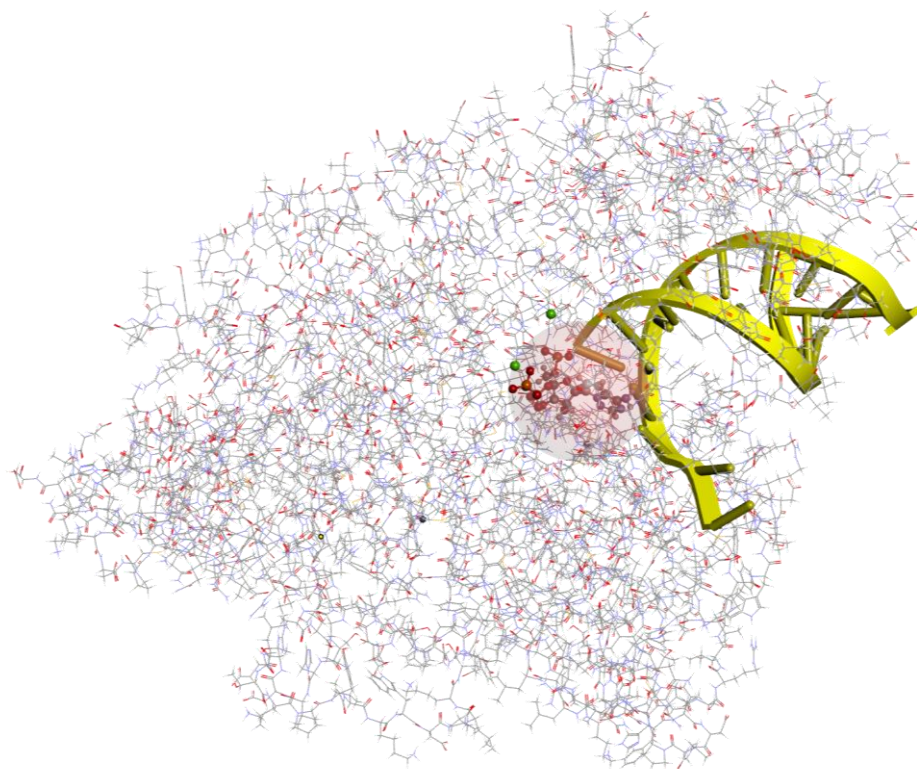


Figure 3. Cryo-electron microscopy structure of RdRp of SARS-CoV-2 with Remdesivir-TP

A cryo-electron microscopy structure of SARS-CoV-2 RdRp (PDB ID: 7BV2) composed of the triphosphate form (RTP) of Remdesivir, the catalytic Mg^{2+} ion, and the nsp12-nsp7-nsp8 complex bound to Template-primer RNA is shown. Here, Template-primary RNA is shown as a yellow ladder model while nsp12, nsp7, and nps8 are shown as lines. The triphosphate form (RTP) of Remdesivir is shown as a stick model and the surface by an atom is shown in light red to clearly illustrate the binding site used in our docking trials. The structure demonstration was made by Discovery Studio Visualizer software.

According to molecular docking results, the docking scores of the 7 compounds were found to be between -8.3 and -7.7 Kcal/mol. As the physiological compounds (ATP and GTP) exhibited binding energies of -7.8 to -7.4 and -7.7 to -7.3 respectively, while the five approved drugs Galidesivir, Remdesivir, Ribavirin, Sofosbuvir, and Favipiravir bound to SARS-CoV-2 RdRp with binding energies of -8.0 to -7.5 for Galidesivir-TP, -8.2 to -7.5 for Remdesivir-TP, -8.3 to -7.9 for Ribavirin-TP, -7.8 to -7.3 for sofosbuvir-TP, and -8.0 to -7.5 for Favipiravir (Fig. 4).

According to the results obtained from molecular docking trials, nucleotide analogs such as Galidesivir, Remdesivir, Ribavirin, Sofosbuvir, and Favipiravir were found to be able to bind to nsp12 associated with template-primer RNA causing inhibition of viral RdRp via non obligate RNA chain

termination. Also, the binding energy values against RdRp for these drugs are better than the native nucleotides. In other words, these drugs have been found to have a higher binding affinity for RdRp compared to ATP and GTP.

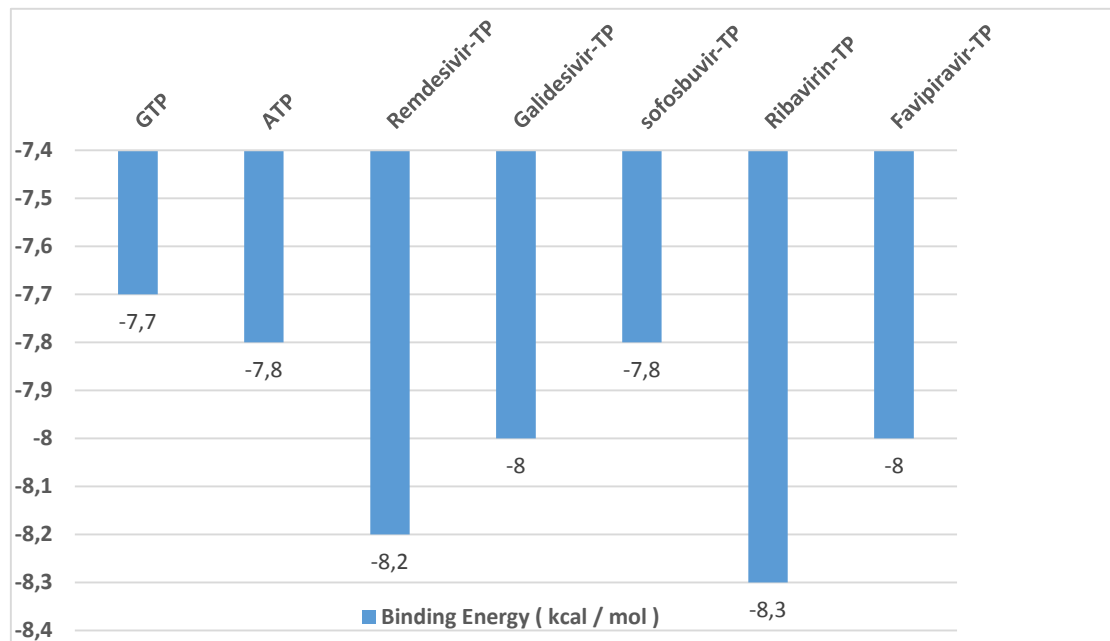


Figure 4. Docking scores of the physiological nucleotides (ATP and GTP) and five purine nucleoside inhibitor drugs approved against different viral RdRps (Galidesivir, Remdesivir, Ribavirin, Sofosbuvir, and Favipiravir) against SARS-CoV-2 RdRp

The models with the highest docking score in all the five drugs are located in the same position as the original Remdesivir-TP in the crystal structure of the target protein. This increases the reliability and accuracy of our molecular docking studies results (Fig. 5).

These approved drugs are thought to cause inhibition by mimicking the nucleoside substrate recognized by viral RNA polymerase. RdRp inhibition is also a superior approach because once these substrate mimetics bind, they are unable to induce virus "repair" and thus permanently block replication [22].

To investigate and discuss more possible interactions, models with the highest docking scores and best positions and configurations obtained from docking results were selected based on recent findings reported in articles and the results of similar studies. At the same time, the positions and configurations of the models produced from the docking trials were compared to the position and configuration of the original ligand (RemdesivirTP) in the crystal structure of the target protein and it was found that these models were the most suitable for studying surface-interaction analysis. According to the previous steps, the Complexes formed between selected models and RdRp were examined with the help of PLIP web-

server, Pymol, and Discovery Studio Visualizer software.

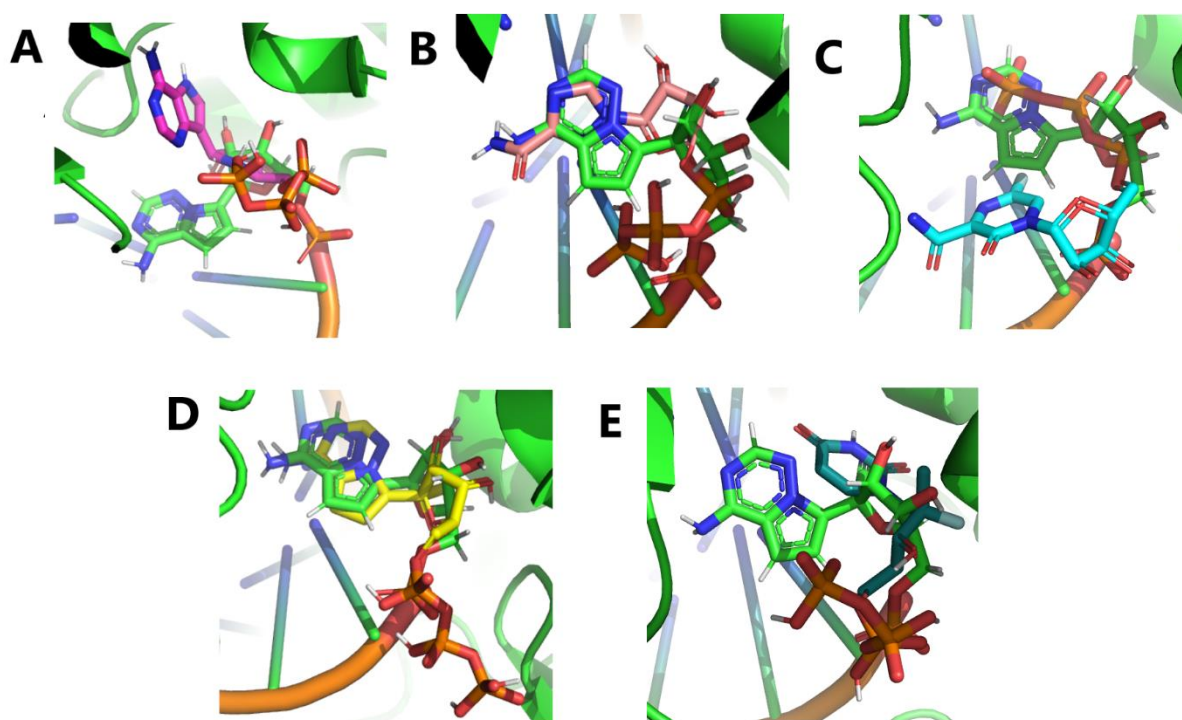


Figure 5. Comparison between the positions of the models produced from docking trials with the position of the original ligand

Here, The original ligand (RemdesivirTP) in the crystal structure of the target protein is shown in green, while;

A: Galidesivir-TP model (-8.0 kcal/mol) is shown in Pink

B: Ribavirin-TP model (-8.3 kcal/mol) is shown in Light orange.

C: Favipiravir-TP model (-8.0 kcal/mol) is shown in Cyan.

D: Remdesivir-TP model (-8.2 kcal/mol) is shown in Yellow.

E: Sofosbuvir-TP model (-7.8 kcal/mol) is shown in Dark Green.

According to the findings reported in different studies conducted on Remdesivir, Remdesivir in its monophosphate form (RMP), forms a covalent bond at the +1 position (via base-stacking interactions) with the 3' end of the RNA primer chain, while interacting with the **uridine base** from the Template strand (via two hydrogen bonds). RMP also interacts with the side chains of **Lys545** and **Arg555** [14,23]. Interacting residues between Nsp12 and Remdesivir were obtained from the cryo-EM construct of SARS-CoV-2 RdRp. A total of 56 residues from Nsp12 were found to interact with Remdesivir. Specifically, certain nsp12 residues such as Ala558, Gly559, **Ser682**, Gly683, Asp684, **Ser759**, **Asp760**, **Asp761**, Cys813, and Ser814 interacted with Remdesivir and template-primer RNA and are required to maintain the catalytic activity of RdRp [23]. Moreover, the catalytic metal ions in SARS-CoV-2 nsp12 are coordinated by ternary aspartate, **Asp618**, **Asp760**, and **Asp761**, and the substrate p-phosphate is stabilized by **Arg555**. **Asp623**, **Ser682**, and **Asn691** residues are observed to play a role in 2'-OH

recognition of the incoming nucleotide [24].

Some of these findings match our findings of the surface-interaction analysis of all the models, that they commonly interact with **Arg555**, **Asp618**, **Asp623**, **Ser682**, **Asn691**, **Ser759**, **Asp760**, and **Asp761** residues (Fig. 6-7). A ligand-protein interaction diagram revealed that important residues of nsp12 are located within the 6Å distance of Remdesivir; showed metal coordination with Mg²⁺, hydrogen bonds of RNA with **Asn691** and **U10**, and a pi-pi-Stacking interaction of Template-primer RNA with **U20** [23]. These findings also match some of our findings of the surface-interaction analysis made within the 5Å distance of all the models, and it was found that they commonly interact with **U10**, **A11**, and **U20** of Template-primer RNA (Fig. 6-7).

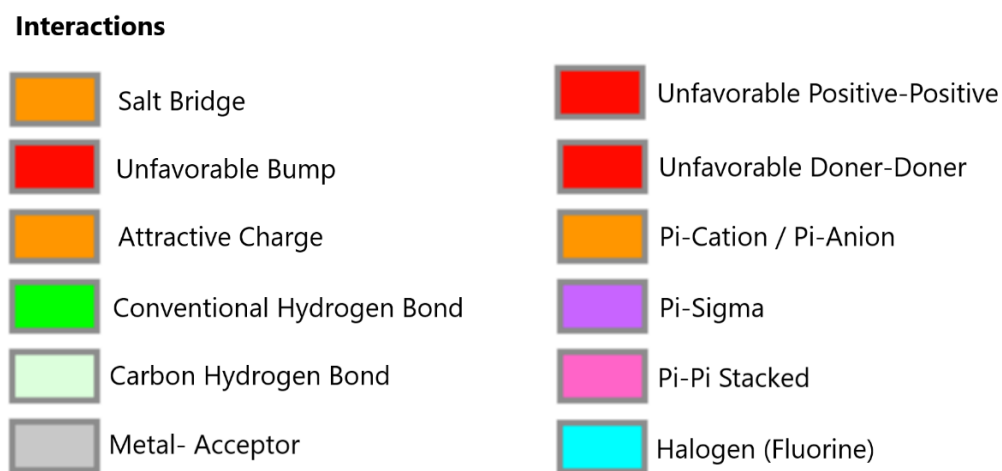


Figure 6. The types of intermolecular interactions are as labeled for all 2D ligand-protein interaction diagrams

To investigate the binding mode of the complexes formed between selected models and RdRp in detail, PLIP web-server and Pymol software were utilized for further 3D investigations.

- The interactions between the selected **Favipiravir-TP model** and RdRp are as follows:

11 H-bonds were formed with Arg555, Ser682 (2), Asn691, Ser759, Asp760 residues, primer U20 (4), and Template U10. In addition, the Favipiravir-TP model formed 2 salt bridges with Arg555 (2) and 1 π -cation interaction with Arg555 (Fig. 8 A)

- While the interactions between the selected **Ribavirin-TP model** and RdRp are as follows:

14 H-bonds were formed with Arg555 (2), Asp623 (2), Ser682, Asn691, Ser759 (2), Asp760 residues, primer U20 (2), Template U10 (2), and A11. In addition, the Ribavirin-TP model formed 2 salt bridges with Arg555 (2), 1 π -cation interaction with Arg555, and π -Stacking interaction with A11 (Fig. 8 B)

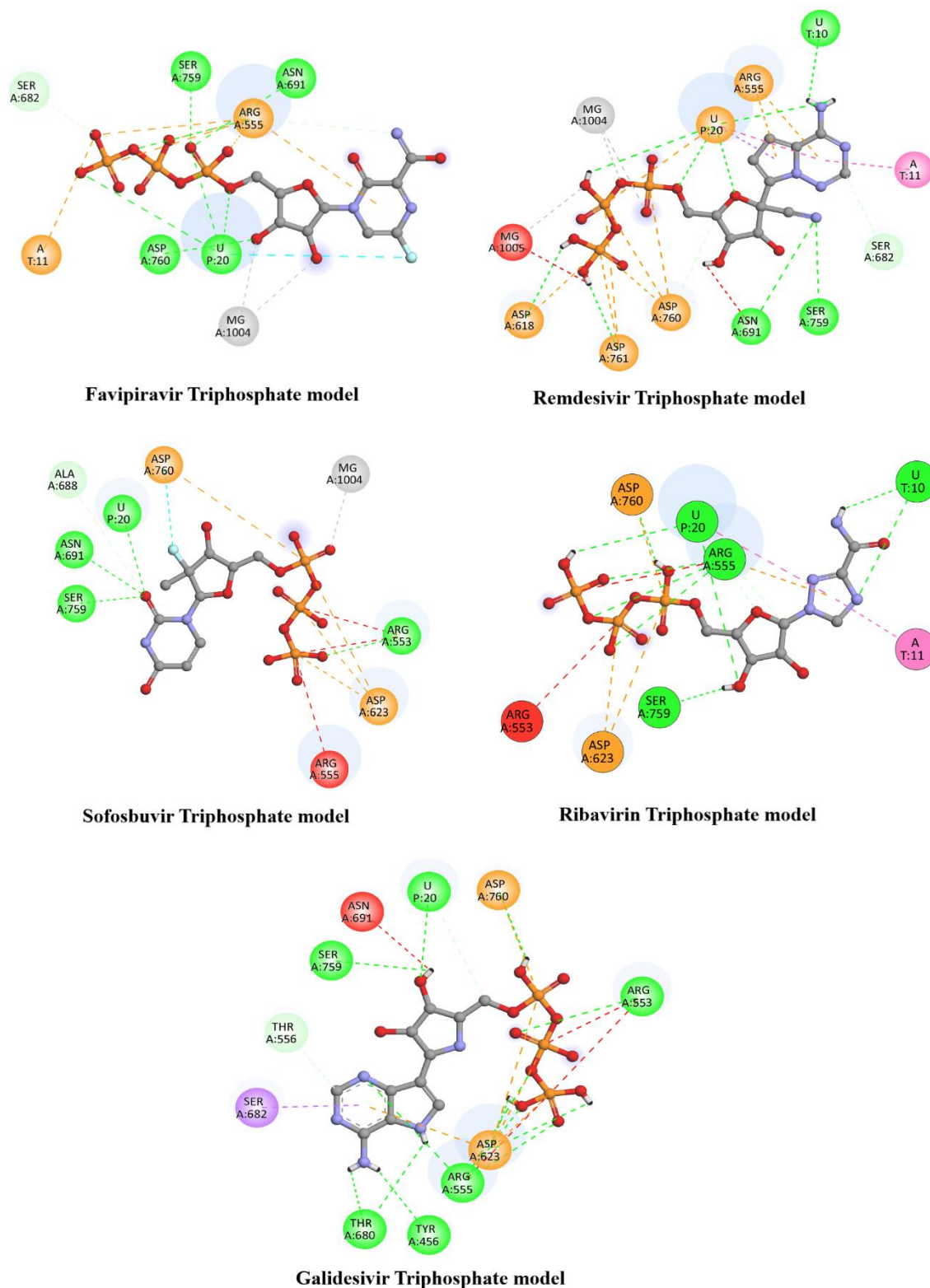


Figure 7. Ligand-protein interaction (2D) diagrams of all tested purine nucleoside inhibitor models, diagrams were made within a 5Å distance of the nsp12-nsp7-nsp8 complex bound to template-primer RNA and the types of interactions were shown as labeled in figure 6, diagrams were made with Discovery Studio Visualizer software

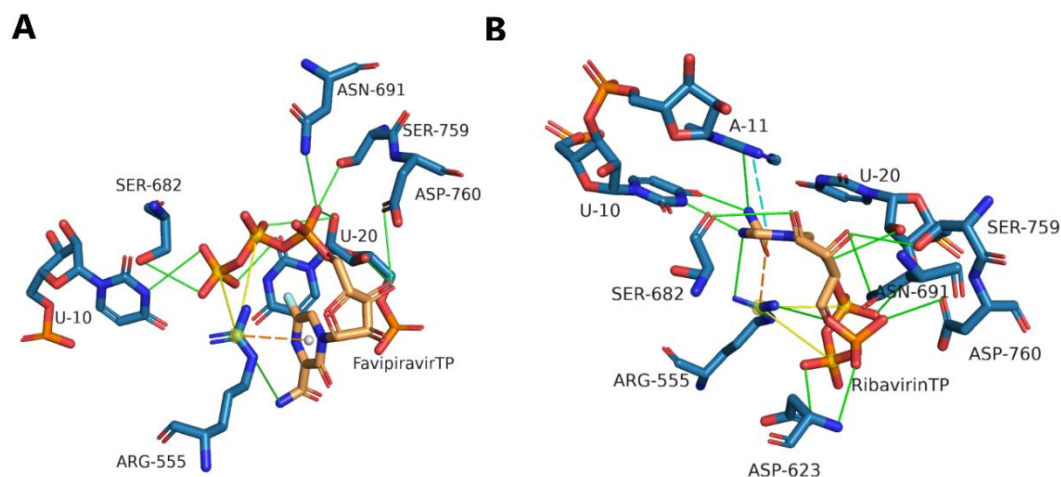


Figure 8. Favipiravir-TP and Ribavirin-TP ligand-protein interactions

Visualization of SARS-CoV-2 RdRp nsp12 active site and docked position with compound Favipiravir-TP and Ribavirin-TP models. Here, solid green lines depict the H-bonds, Solid Yellow lines depict salt-bridges, dashed orange lines depict π -cation interactions while dashed light blue lines depict π -Stacking interactions.

- The interactions between the selected **Remdesivir-TP model** and RdRp are as follows:

10 H-bonds were formed with Arg555, Asn691, Ser759, Asp760 residues, primer U20 (5), and Template U10. In addition, the Remdesivir-TP model formed 2 π -cation interactions with Arg555 (2) and 1 π -stacking interaction with primer U20 (Fig. 9 A)

- While the interactions between the selected **Sofosbuvir-TP model** and RdRp are as follows:

6 H-bonds were formed with Arg555, Asp623, Arg624, Asn691, Ser759 residue, and primer U20. In addition, the Sofosbuvir-TP model formed 3 salt bridges with Arg555 (2), Arg553, and hydrophobic interaction with Asp623 (Fig. 9 B).

- The interactions between the selected **Galidesivir-TP model** and RdRp are as follows:

12 H-bonds were formed with Tyr456, Arg555, Asp623 (3), Thr680 (2), Asn691, Ser759(2), Asp760 residues, and primer U20. In addition, the Galidesivir-TP model formed 4 salt bridges with Arg555 (2), Arg553 (2), and hydrophobic interaction with Asp623 (Fig. 10).

In conclusion, according to the results obtained from molecular docking studies and the results of detailed surface-interaction analysis for different models -which are the most suitable according to their positions and configurations- were found that they **commonly** interact with 9 different amino acids (**Arg553, Arg555, Asp618, Asp623, Ser682, Asn691, Ser759, Asp760, and Asp761**), and 3 different Template-primer RNA nucleotides (**U10, A11, and U20**) causing inhibition of viral RdRp via non obligate RNA chain termination.

In particular, it was found that **all the models** have formed different types of interactions with important residues such as **Arg555, Ser759, Asp760** and with important nucleotides such as forming **π -stacking** interaction with primer **U20** of Template-primer RNA. In addition, it can be said that **Arg555**, in particular, plays a very important role in the inhibition process held by nucleotide analogs because **all**

the models have been found to form at least 2 or 3 different types of interaction with Arg555.

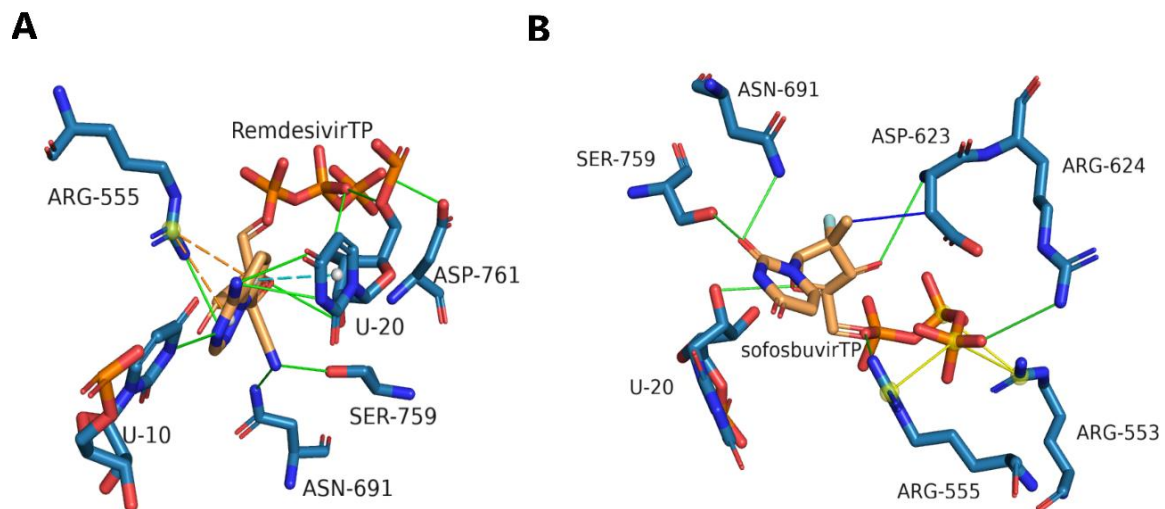


Figure 9. Remdesivir-TP and Sofosbuvir-TP ligand-protein interactions.

Visualization of SARS-CoV-2 RdRp nsp12 active site and docked position with compound Remdesivir-TP and Sofosbuvir-TP models. Here, solid green lines depict the H-bonds, Solid Yellow lines depict salt-bridges, solid blue lines depict hydrophobic interaction, dashed orange lines depict π -cation interactions, while dashed light blue lines depict π -Stacking interactions.

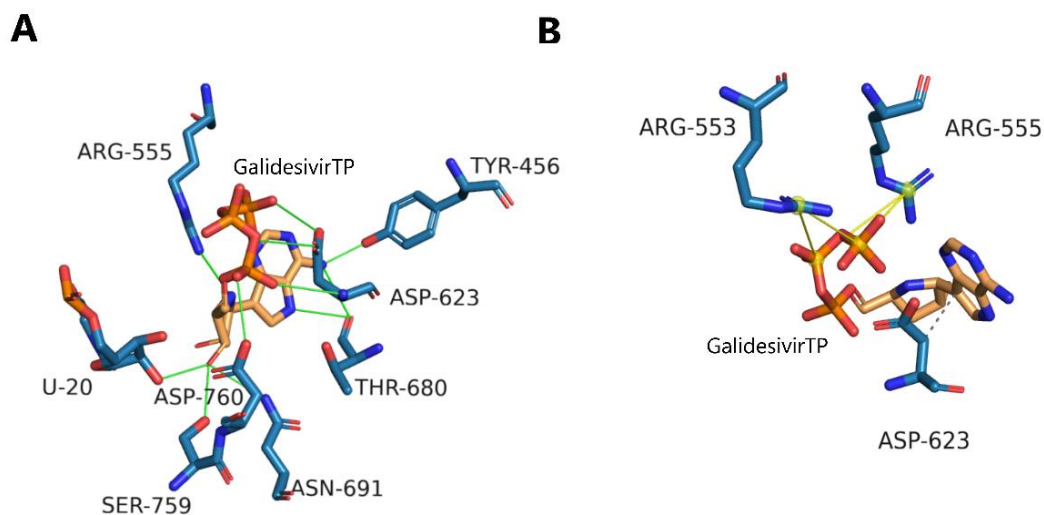


Figure 10. Galidesivir-TP ligand-protein interactions

Visualization of SARS-CoV-2 RdRp nsp12 active site and docked position with compound Galidesivir -TP model. Here, solid green lines depict the H-bonds, Solid Yellow lines depict salt-bridges while dashed grey lines depict hydrophobic interactions.

Taking in regards to the quick rate of mutations that COVID-19 does exhibit, that leads us to question what are the consequences of the possibility of COVID-19 developing a mutation in Arg555 amino acid? And how any mutation in this vital key residue (Arg555) would affect the efficiency of

RdRp inhibitor (nucleotide analogs) drugs.

Based on results obtained from a cohort study of Remdesivir treated patients conducted by Alfredo Mari et al. no potential escape mutation was found in known key residue Nsp12:Arg555, as *in-silico* structural models found that they were unlikely to be associated with loss of stability in RdRp [25]. These findings indicate that RdRp may represent a suitable drug target. A detailed understanding of the interaction of nucleotide analogs and RdRp especially at the atomic level using robust molecular technologies could lead to the development of highly specific and efficient new treatments for COVID-19. Studies aiming to understand the structural and functional properties of key proteins involved in SARS-CoV-2 infection and replication and corresponding drug development activities should continue to be carried out to come out with more promising results.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: S.G., Z.A.A.; Design: S.G., Z.A.A.; Control: S.G., Z.A.A.; Sources: S.G., Z.A.A.; Materials: S.G., Z.A.A.; Data Collection and/or processing: S.G., Z.A.A.; Analysis and/or interpretation: S.G., Z.A.A.; Literature review: S.G., Z.A.A.; Manuscript writing: S.G., Z.A.A.; Critical review: S.G., Z.A.A.; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

The authors declare that the ethics committee approval is not required for this study.

REFERENCES

1. Lai, C.C., Shih, T.P., Ko, W.C., Tang, H.J., Hsueh, P.R. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(3), 105924. [\[CrossRef\]](#)
2. Qu, J., Cao, B., Chen, R. (2020). COVID-19 the essentials of prevention and treatment. Elsevier Science, p. 1-3
3. Pal, M., Berhanu, G., Desalegn, C., Kandi, V. (2020) Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2): An update. *Cureus*, 12(3), e7423. [\[CrossRef\]](#)

4. Zhu, G., Zhu, C., Zhu, Y., Sun, F. (2020). Minireview of progress in the structural study of SARS-CoV-2 proteins. *Current Research in Microbial Sciences*, 1, 53-61. [\[CrossRef\]](#)
5. Xia, X., Wang, Y., Zheng, J. C. (2021). Emerging roles of extracellular vesicles in mediating RNA virus infection. *Fundamental Research*, 1(2), 179-185. [\[CrossRef\]](#)
6. Lele, Z., Mansha, S., Dragoş S., Alvin, C., Jacqueline, G., Jeremy, D., Siobain, D., Julie, K.P. (2019). Existing host range mutations constrain further emergence of RNA viruses. *Journal of Virology*, 93(4), e01385-18. [\[CrossRef\]](#)
7. Ren, B. (2020). The AI-discovered aetiology of COVID-19 and rationale of the irinotecan+ etoposide combination therapy for critically ill COVID-19 patients. *Medical Hypotheses*, 144, 110385. [\[CrossRef\]](#)
8. Rasool, N., Yasmin, F., Sahai, S., Hussain, W., Inam, H., Arshad, A. (2021). Biological perspective of thiazolidine derivatives against Mpro and MTase of SARS-CoV-2: Molecular docking, DFT and MD simulation investigations. *Chemical Physics Letters*, 771, 138463. [\[CrossRef\]](#)
9. Zhu, W., Chen, C., Gorshkov, K., Xu, M., Lo, D., Zheng, W. (2020). RNA-dependent RNA polymerase as a target for covid-19 drug discovery. *Slas Discovery: Advancing The Science Of Drug Discovery*, 25(10), 1141-1151. [\[CrossRef\]](#)
10. Demir-Tekol, S. (2020). SARS-CoV-2: Virolojisi ve tanıda kullanılan mikrobiyolojik testler. *Southern Clinics of Istanbul Eurasia*, 1(1), 8-12. [\[CrossRef\]](#)
11. Boopathi, S., Poma, A., Kolandaivel, P. (2020). Novel 2019 coronavirus structure, mechanism of action, antiviral drug promises and rule out against its treatment. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(9), 3409-3418. [\[CrossRef\]](#)
12. Cheng, Y., Chao, T., Li, C., Chiu, M., Kao, H., Wang, S., Pang, Y., Lin, C., Tsai, Y., Lee, W., Tao, M., Ho, T., Wu, P., Jang, L., Chen, P., Chang, S., Yeh, S. (2020). Furin inhibitors block SARS-CoV-2 spike protein cleavage to suppress virus production and cytopathic effects. *Cell Reports*, 33(2), 108254. [\[CrossRef\]](#)
13. Gao, Y., Yan, L., Huang, Y., Liu, F., Zhao, Y., Cao, L., Wang, T. (2020). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. *Science*, 368(6492), 779-782. [\[CrossRef\]](#)
14. Yin, W., Mao, C., Luan, X., Shen, D., Shen, Q., Su, H., Wang, X., Zhou, F., Zhao, W., Gao, M., Chang, S., Xie, Y., Tian, G., Jiang, H., Tao, S., Shen, J., Jiang, Y., Jiang, H., Xu, Y., Zhang, S., Zhang, Y., Xu, H. (2020). Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir. *Science*, 368(6498), 1499-1504. [\[CrossRef\]](#)
15. Kirchdoerfer, R.N., Ward, A.B (2019). Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors. *Nature Communications*, 10, 2342. [\[CrossRef\]](#)
16. Faheem Kumar, B., Sekhar, K., Kunjiappan, S., Jamalis, J., Balaña-Fouce, R., Tekwani, B., Sankaranarayanan, M. (2020). Druggable targets of SARS-CoV-2 and treatment opportunities for COVID-19. *Bioorganic Chemistry*, 104, 104269. [\[CrossRef\]](#)
17. Wang, M., Cao, R., Zhang, L., Yang, X., Liu, J., Xu, M., Shi, Z., Hu, Z., Zhong, W., Xiao, G. (2020). Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Research*, 30, 269-271. [\[CrossRef\]](#)

18. Eastman, R., Roth, J., Brimacombe, K., Simeonov, A., Shen, M., Patnaik, S., Hall, M. (2020). Remdesivir: A review of its discovery and development leading to emergency use authorization for treatment of COVID-19. *ACS Central Science*, 6, 672-683. [\[CrossRef\]](#)
19. Bhatia, S., Narayanan, N., Nagpal, S., Nair, D.T. (2021). Antiviral therapeutics directed against RNA dependent RNA polymerases from positive-sense viruses. *Molecular Aspects of Medicine*, 10100. [\[CrossRef\]](#)
20. Tian, L., Qiang, T., Liang, C., Ren, X., Jia, M., Zhang, J., Li, J., Wan, M., YuWen, X., Li, H., Cao, W., Liu, H. (2021). RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) inhibitors: The current landscape and repurposing for the COVID-19 pandemic. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 213,113201. [\[CrossRef\]](#)
21. Sharma, P.L., Nurpeisov, V., Hernandez-Santiago, B., Beltran, T., Schinazi, R.F. (2004). Nucleoside inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 4, 895-919. [\[CrossRef\]](#)
22. Tiwari, V., Beer, J., Sankaranarayanan, N., Swanson-Mungerson, M., Desai, U. (2020). Discovering small-molecule therapeutics against SARS-CoV-2. *Drug Discovery Today*, 25(8), 1535-1544. [\[CrossRef\]](#)
23. Padhi, A., Shukla, R., Saudagar, P., Tripathi, T. (2021). High-throughput rational design of the Remdesivir binding site in the RdRp of SARS-CoV-2: implications for potential resistance. *iScience*, 24(1), 101992. [\[CrossRef\]](#)
24. Gordon, C., Tchesnokov, E., Woolner, E., Feng, J., Porter, D., Götte, M. (2020). Remdesivir is a direct-acting antiviral that inhibits RNA-dependent RNA polymerase from severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 with high potency. *Journal of Biological Chemistry*, 295(20), 6785-6797. [\[CrossRef\]](#)
25. Mari, A., Roloff, T., Stange, M., Søgaard, K.K., Asllanaj, E., Tauriello, G., Alexander, L.T., Schweitzer, M., Leuzinger, K., Gensch, A., Martinez, A.E., Bielicki, J., Pargger, H., Siegemund, M., Nickel, C.H., Bingisser, R., Osthoff, M., Bassetti, S., Sendi, P., Battegay, M., Marzolini, C., Seth-Smith, H.M.B., Schwede, T., Hirsch, H.H., Egli, A. (2021). Global genomic analysis of SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase evolution and antiviral drug resistance. *Microorganisms* 19, 9(5), 1094. [\[CrossRef\]](#)



CYTOTOXIC AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF *ALCHEMILLA MOLLIS* (BUSER) ROTHM. AND ITS CONSTITUENTS; HYPEROSIDE AND ISOQUERCETIN

ALCHEMILLA MOLLIS (BUSER) ROTHM. İLE BİLEŞENLERİ HİPEROZİT VE İZOKERSETİNİN SİTOTOKSİK VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİ

Ashı KOÇ¹ , Ekin KURTUL^{2*} , Arzu Zeynep KARABAY¹ , Mehmet TEKİN³ ,
Özlem BAHADIR ACIKARA⁴ 

¹Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, 06100, Ankara, Turkey

²Zonguldak Bulent Ecevit University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 67600, Zonguldak, Turkey

³Trakya University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany, 22030, Edirne, Turkey

⁴Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 06100, Ankara, Turkey

ABSTRACT

Objective: *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. (Rosaceae) is widely distributed in Europe, North Anatolia, Caucasus, North Iran. A commercial drug, "Herba Alchemillae" is obtained from aerial parts of *A. mollis*, is used for its astringent, diuretic, antispasmodic properties as well as for treatment of excessive menstruation and wounds in Bulgarian and Turkish folk medicine. Previous studies have reported that hyperoside, isoquercetin, miquelianin, cis- and trans-tiliroside, sinocrassoside D2 and rhodiogin were detected in *A. mollis*. Present study is aimed to evaluate in vitro antioxidant effects and cytotoxic activities of *A. mollis* methanolic extract and its constituents, hyperoside and isoquercetin, on K562 leukemia cell line.

Material and Method: Spectrophotometric MTT assay and NO radical scavenging assay have been used to test the cytotoxic effects and antioxidant activities, respectively.

Result and Discussion: Results showed that *A. mollis* methanolic extract reduced cell viability of K562 cells at concentrations higher than 0.02 mg/ml whereas the compounds did not exhibit any cytotoxicity at same

* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Ekin Kurtul
e-mail / e-posta: ekurtul@ankara.edu.tr, Phone / Tel.: +905448871390

concentration range. Additionally, significant inhibition on NO radical production was observed for all tested materials.

Keywords: *Alchemilla mollis*, antileukemic activity, antioxidant activity, hyperoside, isoquercetin

ÖZ

Amaç: *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. (Rosaceae) Avrupa, Kuzey Anadolu, Kafkasya ve Kuzey İran'da geniş yayılış göstermektedir. *A. mollis*'in toprak üstü kısımlarından elde edilen ticari ilaç "Herba Alchemillae" Bulgar ve Türk halk tıbbında aşırı adet görme ve yara tedavisinin yanı sıra anstrejan, diüretik, antispazmodik özellikleri için de kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda *A. mollis*'te hiperozit, izokersetin, mikuelianin, cis- ve trans-tilirozit, sinokrassozit D2 ve rodiolgin tespit edildiği bildirilmiştir. Bu çalışmanın amacı *A. mollis*'in metanollü ekstresi ile içerdiği bileşikler, hiperozit ve izokersetinin K562 lösemi hücre hattındaki sitotoksik aktiviteleri ile in vitro antioksidan aktivitelerini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Sitotoksik aktiviteyi test etmek için MTT testi, antioksidan aktiviteyi değerlendirmek için NO radikali süpürücü test kullanılmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Çalışma sonuçları *A. mollis*'in metanollü ekstresinin 0.02 mg/ml'den daha yüksek konsantrasyonlarda K562 hücrelerinin hücre canlılığını azaltırken, bileşiklerin aynı konsantrasyon aralığında herhangi bir sitotoksikite sergilemediğini göstermiştir. Ayrıca, test edilen tüm materyallerin NO radikali üretimini önemli ölçüde inhibe ettiği görülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Alchemilla mollis*, antilösemik aktivite, antioksidan aktivite, hiperozit, izokersetin

INTRODUCTION

Alchemilla genus is one of the largest genera of Rosaceae family with more than 1000 species over the World and 77 species in Turkey [1]. *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. is widely distributed in Europe, North Anatolia, Caucasus and North Iran and grows naturally in north and north-eastern Anatolia in Turkey [2, 3]. *Alchemilla* species are known as findık otu, aslanpençesi, aslan ayağı, dokuztepe, yeditepe, locally [3, 4].

Alchemilla genus has been used against various diseases such as wounds, eczema, erythema, diabetes, gastrointestinal and gynecological disorders, inflammation, diarrhea, asthma, bronchitis and cough [5-13]. Aerial parts of *Alchemilla*, which is used for therapeutic purposes, have been reported to have rich phytochemical content including tannin, flavonoid, proatocyanidin, terpene and the other phenolic compounds [14-17]. Additionally, the angioprotective, antioxidant, antiviral, anticancer, wound healing and antimicrobial activities of *Alchemilla* species have been shown in different studies [14, 17].

A commercial drug, "Herba Alchemillae" is obtained from the aerial parts of *A. mollis*, is used for its astringent, diuretic and antispazmodic properties as well as for treatment of excessive menstruation and wounds in Bulgarian and Turkish folk medicine [15]. Previous studies have reported that hyperoside, isoquercetin, cis- and trans-tiliroside, sinocrassoside D2 and rhodiolgin were detected in *A. mollis* [17]. Our study aimed to test the cytotoxic and antioxidant activities of *A. mollis* and evaluate the role of its constituents; hyperoside and isoquercetin for the potential activities.

MATERIAL AND METHOD

Plant Material and Extraction

Aerial parts of *A. mollis* were collected from Sariyar village, Sivas, Turkey and identified by Hayri Duman. Voucher specimens are deposited in Cumhuriyet University, Faculty of Science Herbarium (CUFH 1344). The plant parts were dried at room temperature then powdered. Powdered material was extracted by macerating with methanol for 24 hours followed by stirring in ultrasonic bath during 1 hour. Methanolic extract was evaporated under vacuum at 40-45°C to obtain crude extract after filtrating [18].

Cytotoxic Activity

Dried extract of *A. mollis*, hyperoside and isoquercetin were dissolved in DMSO. K562 cells were seeded to 24 well plates for incubation with different concentrations of *A. mollis* extract, hyperoside and isoquercetin dissolved in DMSO, cells without treatment were also incubated with the same concentration of DMSO. After 24 hours of incubation, cells were visualized under a light microscope and cellular morphology was examined. Besides examination of cell morphology, cell viability was determined with MTT assay. Briefly, cells were incubated with 5 mg/ml MTT solution. After 4 hours of incubation with MTT agent, formed formazan crystals were dissolved and absorbance at 550 nm was measured [19].

Antioxidant Activity

To analyse NO[•] scavenging activity of extracts, a reaction mixture was prepared with SNP (5mM) in phosphate buffered saline (pH 7.3) with stock solutions (62.5 ug/ml, 125 ug/ml, 250 ug/ml, 500 ug/ml, 1000 ug/ml, 3000 ug/ml) of *A. mollis* extract, hyperoside and isoquercetin in DMSO. The mixture was incubated at 25°C for 3 hours and then mixed with equal volume of Griess agent (1% sulphanilamide in 5% phosphoric acid and 0.1% N-naphthylethylenediamine dihydrochloride) before measuring absorbance at 550 nm [20]. Data obtained from NO scavenging assay were analyzed using Graph Pad Prism 7.00 software. Analysis of variance (ANOVA) and post-hoc Tukey test were used to compare means, and values were considered significant at p<0.05.

RESULT AND DISCUSSION

After incubation of K562 cells with extract, cells were visualized under the light microscope and it was found that the number of viable cells in *A. mollis* treated group was lower than non-treated group and there was significant difference in cell morphology (Figure 1). Cell viability and morphology was not significantly different between non-treated group and hyperoside treated cells.

Then we checked the antioxidant effects of *A. mollis* extract and its constituents. We found that *A. mollis* extract, isoquercetin and hyperoside inhibited SNP induced NO[•] production significantly ($p < 0.05$) at all concentrations (62.5 ug/ml-3000 ug/ml) tested (Figure 3-5). Significant dose dependent inhibition of nitrite levels was also found between some of the doses tested. Briefly, differences between cells treated with *A. mollis* extract were significant except 62.5 ug/ml vs. 125 ug/ml treated, 125 ug/ml vs. 250 ug/ml treated, 250 ug/ml vs. 500 ug/ml treated, 500 ug/ml vs. 1000 ug/ml treated, 1000 ug/ml vs. 3000 ug/ml treated groups. For isoquercetin treated groups, differences between groups were significant except 62.5 ug/ml vs. 125 ug/ml treated, 125 ug/ml vs. 250 ug/ml treated, 250 ug/ml vs. 500 ug/ml treated, 250 ug/ml vs. 1000 ug/ml treated and 1000 ug/ml vs. 3000 ug/ml treated groups. Finally for hyperoside, significant differences were found for all groups except 62.5 ug/ml vs. 125 ug/ml treated, 250 ug/ml vs. 500 ug/ml treated, 500 ug/ml vs. 1000 ug/ml treated, 500 ug/ml vs. 3000 ug/ml treated and 1000 ug/ml vs. 3000 ug/ml treated groups. Results of the MTT assay showed that *A. mollis* treatment (≥ 0.02 mg/ml) decreased viability of K562 cells significantly (Figure 2).

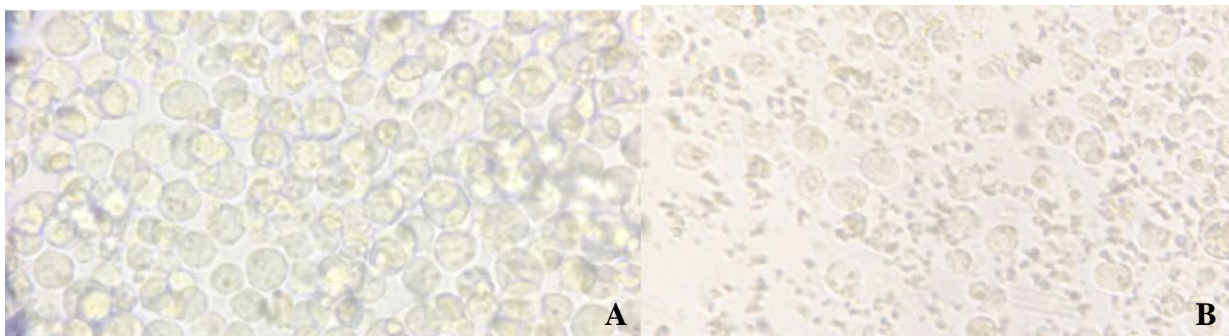


Figure 1. A: Cells without treatment, B: Cells treated with *A. mollis* (0.04 mg/ml)

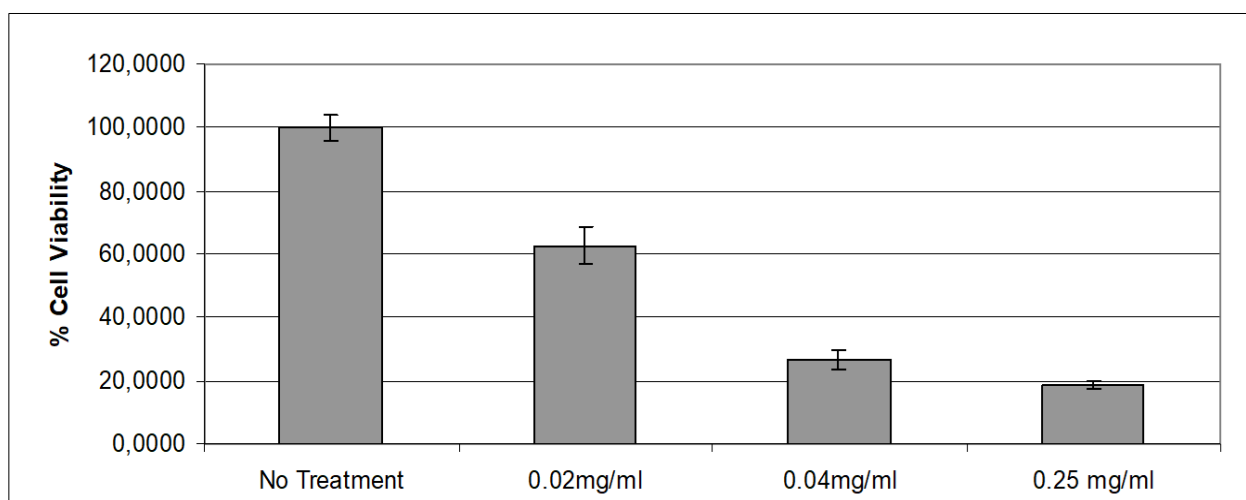


Figure 2. Cell viability of K562 cells treated with or without different concentrations of *A. mollis*

Cell viability decreased significantly ($p \leq 0.05$) at concentrations of *A. mollis* higher than 0.02 mg/ml.

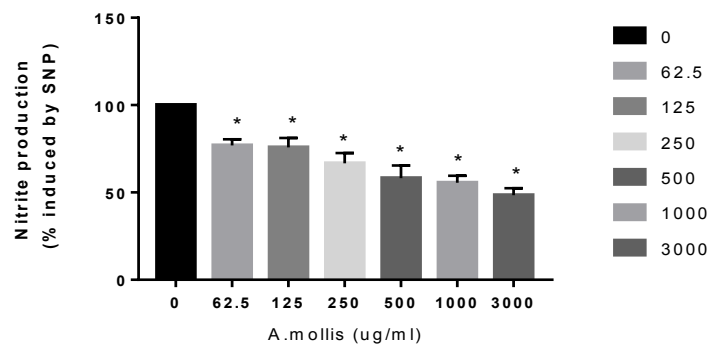


Figure 3. NO[•] scavenging activity of *A. mollis*

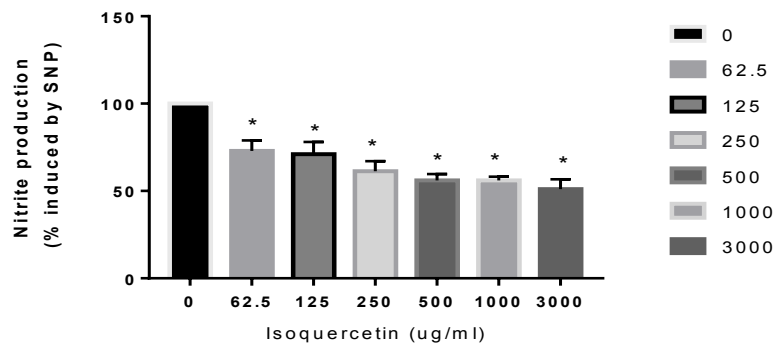


Figure 4. NO[•] scavenging activity of isoquercetin

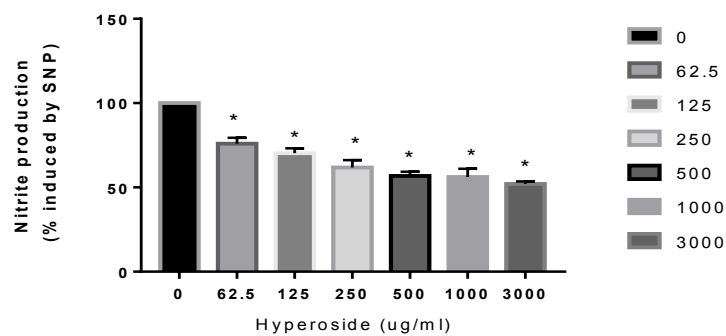


Figure 5. NO[•] scavenging activity of hyperoside

In a previous study, it was reported that the *A. mollis* water extract displayed significant cytotoxic effect between the 62.5-1000 µg/mL concentrations on MCF7 breast cancer cell line. When compared to deodorized water and methanol extracts. The IC₅₀ value of the water, deodorized water and methanol extracts were determined as 59.34±3.41 µg/mL, 87.37±25.15 µg/mL and 68.18±6.12 µg/mL, respectively. Phenolic content of the extracts is considered as responsible for cytotoxicity by the reason of correlation was established between the extracts and the amount of phenolic contents and extract which contains phenolic compound in high amount exhibited the highest cytotoxic activity. It has been suggested that phenolic content is effective on the cytotoxic activity with the mechanisms of radical

scavenging properties. Phenolics display several different mechanisms against the free radicals such as scavenging the free radicals to terminate the radical chain reaction, absorbance of reactive oxygen species (ROS), chelating transition metals, interfering with ROS producing enzymes and stimulating the anti-oxidative enzyme activities. Furthermore, phenolic compounds may act as anti-proliferative agents due to their ability to induce cell cycle arrest, apoptosis, destruction of mitotic spindle formation and inhibit angiogenesis [21].

Phenolic compounds are considered as important secondary metabolites for their chemopreventive and chemotherapeutic effects in cancer. The antioxidant potential of phenolic compounds is almost bolded in the treatment and prevention of cancer [22].

Antioxidant capacity of compounds is associated with mechanisms such as scavenging reactive oxygen species, donating hydrogen atoms or electrons, chelating metal cations, and enhancing the production of antioxidant enzymes and thus acting at a prevention level [23].

Phenolic compounds which display antioxidant activity are among the most abundant bioactive phytochemicals found in our diet which act as natural cancer chemopreventive agents. Generally, their anticancer activities have been attributed to their antioxidant properties, antiproliferative effects, and the activation and/or inhibition of some subcellular signaling pathways, namely apoptosis and cell cycle progression [24].

In conclusion, our results exhibit significant cytotoxic effect for *A. mollis* and significant NO[•] scavenging activity for *A. mollis* and its constituents isoquercetin and hyperoside. Further research may reveal which constituents of *A. mollis* are responsible for the inhibition of cell viability of K562 cells.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: *Ö.B.A.*; Design: *Ö.B.A.*; Control: *M.T., Ö.B.A.*; Sources: *A.K., A.Z.K., M.T., Ö.B.A.*; Materials: *A.K., A.Z.K., M.T., Ö.B.A.*; Data collection and/or processing: *A.K., E.K., A.Z.K., Ö.B.A.*; Analysis and/or interpretation: *A.K., A.Z.K., Ö.B.A.*; Literature review: *E.K., Ö.B.A.*; Manuscript writing: *E.K., Ö.B.A.*; Critical review: *A.K., E.K., A.Z.K., M.T., Ö.B.A.*; Other: *M.T., Ö.B.A.*

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

The authors declare that the ethics committee approval is not required for this study.

REFERENCES

1. Renda, G., Özel, A., Barut, B., Korkmaz, B., Soral, M., Kandemir, Ü., Liptaj, T. (2018). Bioassay guided isolation of active compounds from *Alchemilla barbatiflora* Juz. *Records of Natural Products*, 12(1), 76-85. [\[CrossRef\]](#)
2. Vitkova, A., Gavrilova, A., Tashev, A. (2011). *Alchemilla mollis* (Rosaceae)-a critically endangered species in Bulgaria. *Phytologia Bulgaria*, 17(1), 83-88.
3. Ozbek, H., Bahadır Acikara, O., Keskin, I., Kirmizi, N.I., Ozbilgin, S., Ergene Oz, B., Kurtul, E., Ozrenk, B.C., Tekin, M., Saltan, G. (2017). Evaluation of hepatoprotective, and antidiabetic, activity of *Alchemilla mollis*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 86, 172-176. [\[CrossRef\]](#)
4. Turk, M., Kaya, B., Menemen, Y., Oguztuzun, S. (2011). Apoptotic and necrotic effects of plant extracts belonging to genus *Alchemilla* L. species on HeLa cells in vitro. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(18), 4566-4571.
5. Baytop, T. (1999). Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi Geçmişte ve Bugün, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, p. 370.
6. Sagirolu, M., Arslanturk, A., Akdemir, Z.K., Turna, M. (2012). An ethnobotanical survey from Hayrat (Trabzon) and Kalkandere (Rize/Turkey). *Biological Diversity and Conservation*, 5(1), 31-43.
7. Saraç, D.U., Ozkan Z.A., Akbulut S. (2013). Ethnobotanic features of Rize/Turkey province. *Biological Diversity and Conservation*, 6(3), 57-66.
8. Akbulut, S., Bayramoğlu, M.M. (2014). Reflections of socio-economic and demographic structure of urban and rural on the use of medicinal and aromatic plants: the sample of Trabzon Province. *EthnoMedicine*, 8(1), 89-100. [\[CrossRef\]](#)
9. Akbulut, S., Ozkan, Z.C. (2014). Traditional usage of some wild plants in Trabzon region (Turkey). *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 14(1), 135-145.
10. Kaval, I., Behcet, L., Cakılcıoğlu, U. (2014). Ethnobotanical study on medicinal plants in Geçitli and its surrounding (Hakkari-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 155(1), 171-184. [\[CrossRef\]](#)
11. Guzel, Y., Guzelsemme, M., Miski, M. (2015). Ethnobotany of medicinal plants used in Antakya: A multicultural district in Hatay Province of Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 174, 118-152. [\[CrossRef\]](#)
12. Kalankan, G., Özkan, Z.C., Akbulut, S. (2015). Medicinal and aromatic wild plants and traditional usage of them in Mount Ida (Balıkesir/Turkey). *Journal of Applied Biological Sciences*, 9(3), 25-33.
13. Mukemre, M., Behcet, L., Cakılcıoğlu, U. (2015). Ethnobotanical study on medicinal plants in villages of Çatak (Van-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 166, 361-374. [\[CrossRef\]](#)
14. Condrat, D., Szabo, M.R., Crisan, F., Lupea, A.X. (2009). Antioxidant activity of some phanerogam plant extracts. *Food Science and Technology Research*, 15(1), 95-98. [\[CrossRef\]](#)

15. Makau, J.N., Watanabe, K., Kobayashi N. (2013). Anti-influenza activity of *Alchemilla mollis* extract: Possible virucidal activity against influenza virus particles. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 7(3), 189-195.
16. Ergene, B., Bahadır Acıkara, Ö., Bakar, F., Saltan, G., Nebioğlu, S. (2010). Antioxidant activity and phytochemical analysis of *Alchemilla persica* Rothm. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara*, 39(2), 145-154. [\[CrossRef\]](#)
17. Küpeli Akkol, E., Demirel, M.A., Bahadır Acıkara, Ö., Süntar, İ., Ergene, B., İlhan, M., Özbilgin, S., Saltan, G., Keleş, H., Tekin, M. (2015). Phytochemical analyses and effects of *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. and *Alchemilla persica* Rothm. in rat endometriosis model. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 292, 619-928. [\[CrossRef\]](#)
18. Trendafilova, A., Todorova, M., Nikolova, M., Gavrilova, A., Vitkova, A. (2011). Flavonoid constituents and free radical scavenging activity of *Alchemilla mollis*. *Natural Product Communications*, 6(12), 1851-1854. [\[CrossRef\]](#)
19. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63. [\[CrossRef\]](#)
20. Marcocci, L., Maguire, J.J., Droyl-Lefaix, M.T., Packer, L. (1994). The nitric oxide scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 201, 748-755. [\[CrossRef\]](#)
21. Şeker Karatoprak, G., İlgün, S., Koşar, M. (2017). Phenolic composition, anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial activities of *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. *Chemistry & Biodiversity*, 14(9), 1-19. [\[CrossRef\]](#)
22. Perveen, S., Al-Taweel, A.M. (2017). Phenolic compounds from the natural sources and their cytotoxicity. In: Soto-Hernandez, M., Palma-Tenango, M., Garcia-Mateos, M.R. (Eds.), *Phenolic Compounds-Natural Sources, Importance and Applications*, (pp. 29-60). InTechOpen.
23. Soumya, K., Haridas, K.R., James, J., Sameer Kumar, V.B., Edatt, L., Sudheesh, S. (2019). Study of *in vitro* antioxidant and DNA damage protection activity of a novel luteolin derivative isolated from *Terminalia chebula*. *Journal of Taibah University for Science*, 13, 755-763. [\[CrossRef\]](#)
24. Saenglee, S., Jogloy, S., Patanothai, A., Senawong, T. (2016). Cytotoxic effects of peanut phenolic compounds possessing histone deacetylase inhibitory activity on human colon cancer lines. *Turkish Journal of Biology*, 40(5), 1258-1271. [\[CrossRef\]](#)



TARGETTING THE 3BGQ - PIM1 KINASE INTERACTION WITH A SERIES OF NOVEL DITHIOCARBAMATE SUBSTITUTED 2- OXOINDOLE DERIVATIVES - *IN SILICO* STUDIES

*3BGQ - PIM1 KİNAZ ETKİLEŞİMİNİ HEDEF ALAN YENİ DİTİYOKARBAMAT İLE
SÜBSTİTÜE 2-OKSOİNDOL TÜREVLERİNİN İN SİLİKO ÇALIŞMALARI*

Muni Sireesha SUNKARA¹ , Dharani ANNEPALLY² , Donna Kanthi BITLA² , Sushma BOPPY² , Pallavi CHIDURALA² , Jhansi CHILUKA² , Saritha Jyostna TANGEDA^{2*} 

¹Osmania University, Sarojini Naidu Vanita Pharmacy Maha Vidyalaya, Department of
Pharmacoinformatics, 500007, Hyderabad, India

²Osmania University, Sarojini Naidu Vanita Pharmacy Maha Vidyalaya, Department of
Pharmaceutical Chemistry, 500007, Hyderabad, India

ABSTRACT

Objective: Cancer is the major cause of mortality in most of the developing countries. Enormous chemotherapeutic agents developed are still need improvements in survival rates and quality of life for cancer patients. Pro-viral Integration site of Moloney murine leukemia virus (PIM1) is a family of serine/threonine kinase, regulated by calcium/calmodulin have been identified as a unique molecular target in oncogenesis. PIM1 has significant role in cell cycle regulation, cell survival, apoptosis, cellular senescence, drug resistance and it is emerging as a potential biomarker in number of human malignancies. Today many interesting PIM1 inhibitors are developed and few withdrawn from phase I and 2 clinical trials, due to lack of bioavailability and toxicity. Hence the purpose of the present study is to develop more potent and less toxic compounds.

Material and Method: A series of novel 2-oxindoles with dithiocarbamates were designed as PIM1 inhibitors. All molecules were subjected to Molsoft, Molinspiration, Swiss ADME and pkCSM to predict their molecular properties which are important for drug candidate. Further, in order to find the binding affinity of designed molecules with PIM1 kinase protein and to rationalize their anticancer activity, molecular docking study was performed.

Result and Discussion: Results revealed that all designed compounds fulfilled the criteria for good oral bioavailability, low toxicity and the potential inhibitory activities. All of them were docked into active site of

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Saritha Jyostna Tangeda
e-mail / e-posta: sarithavanita13@gmail.com, **Phone / Tel.:** +919848928766

PIMI kinase with AutoDock Vina software. In conclusion, according to the binding energy values, compound 16 and 24 showed equivalent dock score -9.7 kcal/mol which are comparable with previously reported compounds AZ1208 and SGI 1776. This finding will help the researchers in the design of a better drug for the treatment of cancer.

Keywords: AutoDock Vina, dithiocarbamate, PIMI Kinase, QSAR, 2-oxindole

ÖZ

Amaç: Kanser, gelişmekte olan ülkelerin çoğunda başlıca ölüm nedenidir. Geliştirilen muazzam kemoterapötik ajanların, kanser hastalarının hayatta kalma oranları ve yaşam kaliteleri açısından hala iyileştirilmeleri gerekmektedir. Moloney murin lösemi virüsünün (PIMI) pro-viral entegrasyon bölgesi, kalsiyum/kalmodulin tarafından düzenlenen bir serin/treonin kinaz ailesidir, onkogenezde benzersiz bir moleküler hedef olarak tanımlanmıştır. PIMI hücre döngüsü düzenlenmesi, hücre sağkalımı, apoptozu, hücre yaşlanması ve ilaç direncinde önemli bir role sahiptir ve insan malignitelerinin sayısında potansiyel bir biyobelirteç olarak ortaya çıkmaktadır. Bugün birçok ilginç PIMI inhibitörü geliştirildi ve biyoyararlanım ve toksisite eksikliği nedeniyle birkaçı faz 1 ve 2 klinik çalışmalardan çekildi. Dolayısıyla bu çalışmanın amacı, daha güçlü ve daha az toksik bileşikler geliştirmektir.

Gereç ve Yöntem: Ditiyokarbamat içeren bir seri yeni 2-oksindoller PIMI inhibitörü olarak tasarlandı. Tüm moleküllerin ilaç adayı için önemli olan moleküler özelliklerini tahmin etmek için Molsoft, Molinspiration, Swiss ADME ve pkCSM programları kullanıldı. Ayrıca, tasarlanan bileşiklerin PIMI kinaz proteini ile bağlanma afinitelerini bulmak ve antikanser aktivitelerini rasyonalize etmek için, moleküler yerleştirme çalışması yapıldı.

Sonuç ve Tartışma: Sonuçlar, tasarlanan tüm bileşiklerin iyi oral biyoyararlanım, düşük toksisite ve potansiyel inhibitör aktiviteler için kriterleri karşıladığını ortaya koymaktadır. Tüm bileşiklerin PIMI kinazın aktif bölgesine yerleştirilmesi Auto DockVina yazılımı ile gerçekleştirildi. Sonuç olarak, bağlanma enerjisi değerlerine göre, bileşik 16 ve 24 daha önce bildirilen AZ1208 ve SGI 1776 bileşikleriyle karşılaştırılabilir eşdeğer dock skoru -9.7 Kcal/mol gösterdi. Bu bulgu, araştırmacılara kanser tedavisi için daha iyi bir ilacın tasarımında yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: AutoDock Vina, ditiyokarbamat, PIMI Kinaz, QSAR, 2-oksoindol

INTRODUCTION

Pro-viral Integration site of Moloney murine leukemia virus (PIM) are a family of serine/threonine kinases of calcium/calmodulin-dependent [1]. PIM kinases include three genes-PIM1, PIM2 and PIM3. They are involved in multiple human cancers including prostate cancer, acute myeloid leukemia, and other hematopoietic malignancies. PIM 1 kinases are unique and divergent from other kinases with greater than 60% parity amongst each member [2]. PIM 1 kinase play an important role in multiple cellular functions which include cell cycle regulation, cell survival, apoptosis, cellular senescence, and drug resistance [3]. The inhibitors which inhibit or slow the chemical action of PIM 1 kinases include flavonoids, cinnamic acids, Isoxazoloquinoline-3,4diones, benzoisoxazoles, imidazole (1,2-b) pyridazines, most of them are in clinical trials [4]. Although these compounds have exhibited good potency and minimal toxicities *in vitro* cell lines, their clear toxicity analysis is still being undertaken by researchers worldwide and there is wide scope to develop new leads. Other side, oxindole has emerged as a valuable scaffold in medicinal chemistry possessing diverse range of pharmacological activities [5]. The synthetic oxindole derivatives Sunitinib is marketed anti-cancer agent for gastrointestinal stromal tumors and metastatic renal cell cancer [6]. Further optimization of the

substituents around the oxindole nucleus resulted in several oxindole based kinase inhibitors that are in clinical trials SU11248, SU5416, SU5614, SU6668, SU14813 and SU4984 [7]. In view of the literature, we designed a novel 2-oxindole with substitution of dithiocarbamate at 3rd and electron releasing or electron donating groups at sixth position as shown in fig. 1. Molecular docking can strongly support and help the design of novel, more potent inhibitors by revealing the mechanism of drug-receptor interaction.

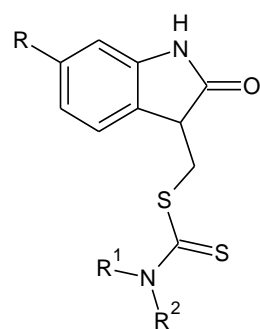


Figure 1. General structure of designed 2-oxindole derivatives as PIM1 inhibitors.

Table 1. Structures and IUPAC names of the designed oxindole derivatives

Compound Code	Compound Structure	Chemical Name
1.		(2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methyl diethylcarbamodithioate
2.		(2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methyl pyrrolidine-1-carbodithioate
3.		(2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methyl piperidine-1-carbodithioate

Table 1 (continued). Structures and IUPAC names of the designed oxindole derivatives.

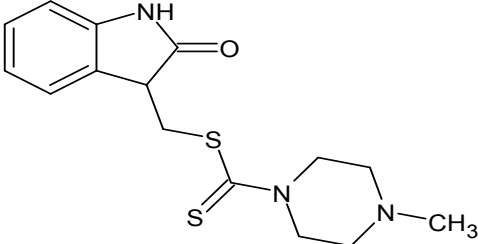
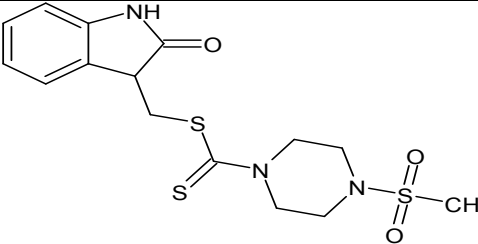
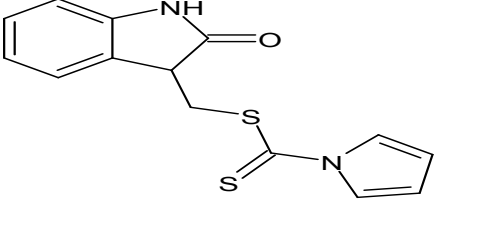
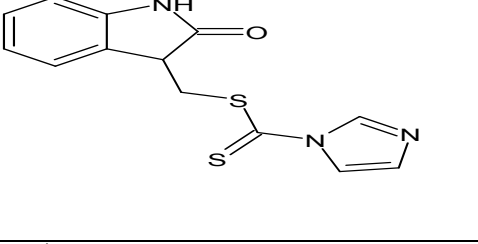
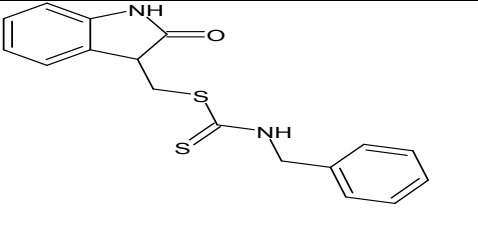
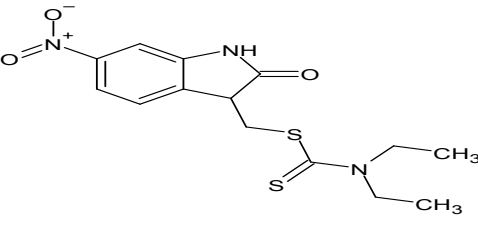
4.		(2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methyl 4-methylpiperazine-1-carbodithioate
5.		(2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methyl 4-(methanesulfonyl)piperazine-1-carbodithioate
6.		(2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methyl 1 <i>H</i> -pyrrole-1-carbodithioate
7.		(2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methyl 1 <i>H</i> -imidazole-1-carbodithioate
8.		(2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methyl benzylcarbomodithioate
9.		(5-nitro-2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methyl diethylcarbomodithioate

Table 1 (continued). Structures and IUPAC names of the designed oxindole derivatives

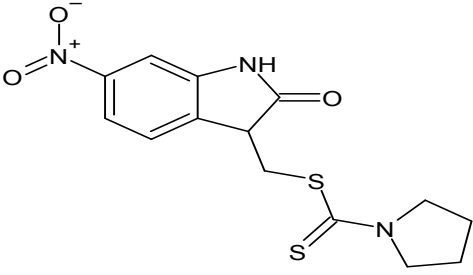
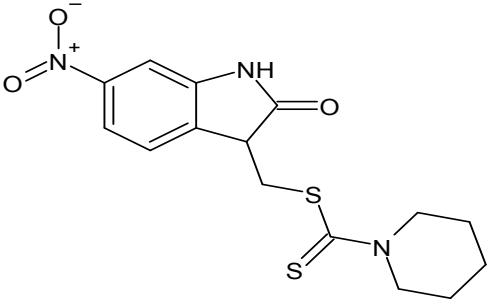
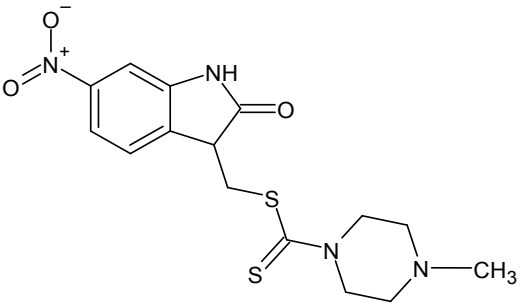
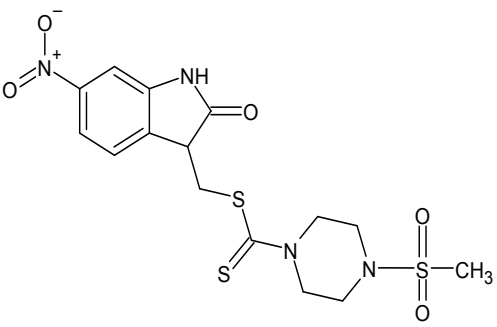
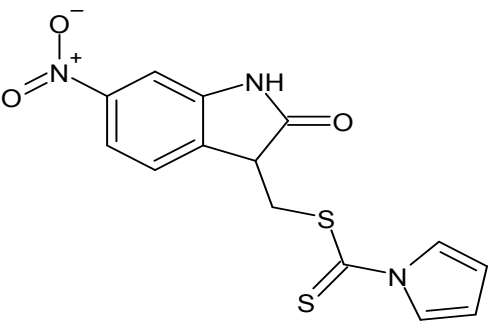
10.		(5-nitro-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl)methyl pyrrolidine-1-carbodithioate
11.		(5-nitro-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl)methyl piperidine-1-carbodithioate
12.		(5-nitro-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl)methyl 4-methylpiperazine-1-carbodithioate
13.		(5-nitro-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl)methyl 4-(methanesulfonyl)piperazine-1-carbodithioate
14.		(5-nitro-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl)methyl 1H-pyrrole-1-carbodithioate

Table 1 (continued). Structures and IUPAC names of the designed oxindole derivatives

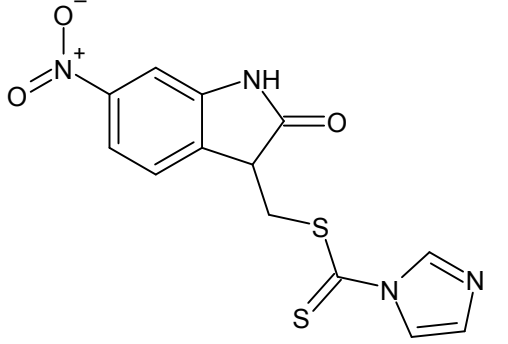
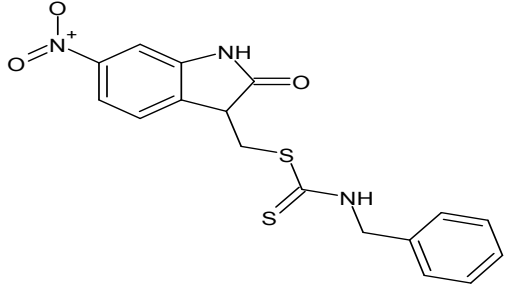
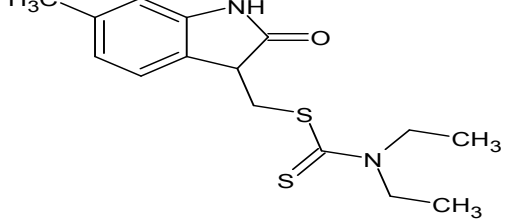
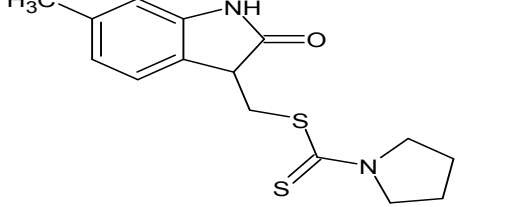
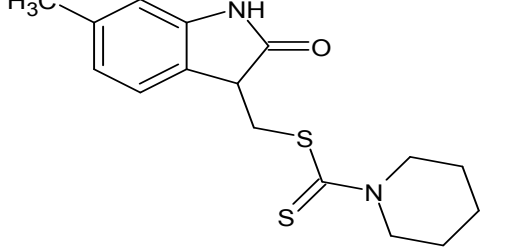
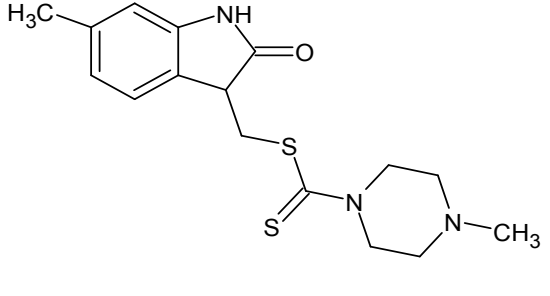
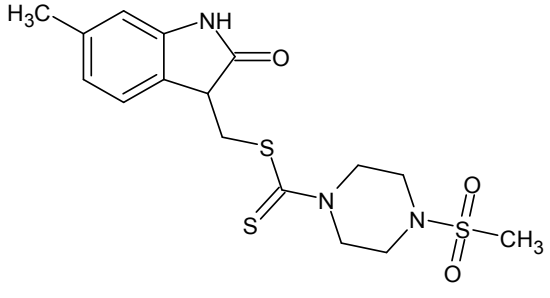
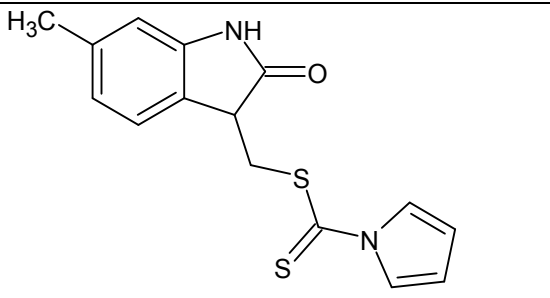
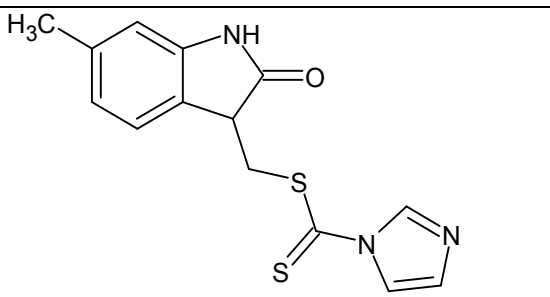
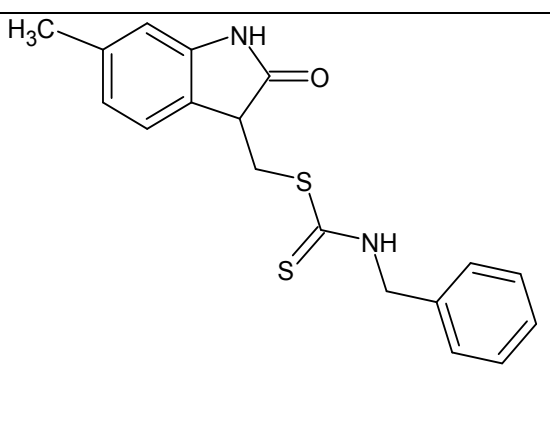
15.		(5-nitro-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl)methyl 1H-imidazole-1-carbodithioate
16.		(5-nitro-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl)methyl benzylcarbamodithioate
17.		(5-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl)methyl diethylcarbamodithioate
18.		(5-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl)methyl pyrrolidine-1-carbodithioate
19.		(5-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl)methyl piperidine-1-carbodithioate

Table 1 (continued). Structures and IUPAC names of the designed oxindole derivatives

20.		(5-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methyl 4-methylpiperazine-1-carbodithioate
21.		(5-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methyl 4-(methanesulfonyl)piperazine-1-carbodithioate
22.		(5-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methyl 1 <i>H</i> -pyrrole-1-carbodithioate
23.		(5-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methyl 1 <i>H</i> -imidazole-1-carbodithioate
24.		(5-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methyl benzylcarbamdithioate

MATERIAL AND METHOD

Molecular Descriptors, Bioactivity Prediction and ADMET Properties

In the drug discovery process, computational (*in silico*) enables optimization of lead molecules by comparing absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADMET) properties and screening of molecules [8]. Data sets of 24 molecules have been chosen for this study. The softwares used are SwissADME (Free, CC-BY 4.0 Creative Commons 4.0 International License, Swiss Institute of Bioinformatics, Switzerland), Molsoft (Free, Molsoft LLC, US), Molinspiration Cheminformatics free web services (Slovensky Grob, Slovakia), pkCSM (Free, Bio 21 Institute University of Melbourne, 30 Flemington Rd Parkville, Melbourne, Australia). The molecules were subjected to Swiss ADME; a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. This server is useful in the prediction of properties like number of hydrogen bond donor, number of hydrogen bond acceptor, molar refractivity, total polar surface area (TPSA), Lipinski violation [9]. Molsoft; a leading provider of tools, databases and consulting services in the area of structure prediction, structural proteomics, bioinformatics, cheminformatics, molecular visualization and animation and rational drug design. From this server, log P (o/w) values are predicted [10]. Molinspiration; offers broad range of cheminformatics software tools supporting molecule manipulation and processing, including SMILES and SD file conversion, normalization of molecules, generation of tautomer's, molecule fragmentation, calculation of various molecular properties needed in QSAR, molecular modelling and drug design, high quality molecule depiction. This software is used to predict GPCR ligand, ion channel modulator, kinase inhibitor, nuclear receptor ligand, protease inhibitor, enzyme inhibitor [11]. pkCSM (Free, Bio 21 Institute University of Melbourne, 30 Flemington Rd Parkville, Melbourne, Australia); a novel method for predicting and optimizing small molecule pharmacokinetic and toxicity properties which relies on distance-based graph signatures. It predicts their pharmacokinetic (absorption, distribution, metabolism, excretion) and toxicity (ADMET) properties. It helps in the prediction of human intestinal absorption (HIA%), *in vitro* skin permeability, *in vitro* VDss (human), *in vitro* blood brain barrier permeability and toxicity [12].

Molecular Docking Studies

The molecular modelling-based approach was adopted to understand the structure of the PIM1 protein along with binding efficiency of various ligand molecules considered for this study. The three-dimensional (3D) structure of PIM1 kinase (PDB ID: 3BGQ) was downloaded from Brook heaven Protein Data Bank and saved as a Brookhaven protein data bank file [16]. The 2D structures of ligands were generated from the ACD/Chemsketch Software. The generated ligands cleaned and performed 3D optimization then saved in the MDL Molfile format. The ligands were then converted to a PDB file

format using the Open Babel chemistry toolbox. AutoDock Vina [18] (Academic version.1.2.0, Molecular Graphics Lab (now CCSC) at The Scripps Research Institute) was used for molecular docking studies. A grid was generated around the co-crystallized ligand. The co-ordinates ($x = -8.298$, $y = 40.748$, $z = 0.228$) were generated with the help of MGL Tools and Pharmit: interactive exploration of chemical space [17]. Prepared pdbqt files for both target and ligands. Created in house batch file of ligands and target and docking performed in the absence of water molecules for all 26 molecules (24 + 2 standard molecules) [19]. The molecules were analysed after docking and visualized in the discovery studio for the interactions with the active site amino acids [13].

RESULT AND DISCUSSION

Molecular Properties

The molecular properties of the designed compounds **1-24** were predicted shown in Table 2. It is observed that all the compounds have significant HIA capacity as the value ranges from 78.59 to 93.80. And compounds are less permeable to Caco-2 cells with the range of values between 0.69-1.54 cm/sec. The *in vivo* blood brain barrier penetration values are ranged from -0.773 to 0.386 confirming them as CNS inactive compounds. The toxicity evaluation revealed that all the compounds are non-toxic in terms of mutagenicity, tumorigenicity, irritancy, hepatotoxicity and reproductive toxicity. Additionally, we have compared the above properties of designed compounds with reported PIM 1 Kinase inhibitors, SGI 1776 and AZ 1208. This over all evaluation has proved that the compounds are safer to the normal cells and suitable anti-tumor agents.

The bioactivity parameters of compounds **1-24** (Table 3) like G Protein-coupled Receptor (GPCR) Ligand property, ion channel modulator, kinase inhibitor, nuclear receptor ligand interactions, protease inhibitor and enzyme inhibitor were predicted for the designed compounds and compared with the values of SGI 1776 and AZ 1208. The results support them as safer compounds with good binding capacities and cell growth inhibitors.

The predicted Lipinski properties of **1-24** (Table 4) with valid scorings bolster and their safer drug behaviour. An orally available drug is elected to be in agreement with Lipinski's rule if the molecular weight is less than 500 Daltons, the number of hydrogen bond donors is less than 5, the number of hydrogen bond acceptors is less than 10, the partition co-efficient ($\log P$) value is less than 5 and the molecular refractivity is within the range. The results exhibit that compounds stratify to Lipinski's, so they should theoretically manifest good oral absorption. The total polar surface area was calculated and is observed that the value is less than 140 for most of the compounds. This acceptability with respect to Lipinski rule proves them as safe administrable drugs and establishes their pharmacological activity [14 and 15].

Table 2. Predicted molecular properties of the designed oxindole derivatives

Compd code	Human intestinal absorption (HIA, %) ^a	<i>In Vitro</i> Caco-2 Cell Permeability (log Papp in 10-6cm/s) ^b	<i>In Vitro</i> skin Permeability (log Kp) ^c	<i>In vitro</i> VDss (human) (log L/kg) ^d	<i>In vitro</i> blood-brain barrier permeability (log BB) ^e	Toxicity
1.	90.692	1.376	-3.184	0.254	0.225	Non toxic
2.	90.527	1.545	-2.67	0.354	0.269	Non toxic
3.	90.138	1.548	-2.688	0.384	0.282	Non toxic
4.	91.836	1.364	-3.376	0.762	0.203	Non toxic
5.	86.373	0.691	-3.049	-0.136	-0.616	Non toxic
6.	91.997	1.74	-2.607	0.066	0.356	Non toxic
7.	93.366	0.91	-2.735	-0.027	0.386	Non toxic
8.	92.187	1.49	-3.098	0.477	0.222	Non toxic
9.	88.313	0.881	-2.801	0.135	-0.328	Non-toxic
10.	90.393	0.853	-2.799	0.209	-0.168	Non-toxic
11.	90.005	0.854	-2.799	0.237	-0.146	Non-toxic
12.	89.457	0.901	-2.839	0.644	-0.688	Non-toxic
13.	78.59	1.014	-2.799	-0.141	-0.773	Non-toxic
14.	89.984	0.88	-2.769	-0.026	-0.465	Non-toxic
15.	89.554	0.897	-2.735	0.596	-0.919	Non-toxic
16.	88.446	0.9	-2.766	0.126	-0.358	Non-toxic
17.	90.531	1.216	-3.178	0.288	0.189	Non-toxic
18.	91.797	1.238	-2.983	0.493	0.259	Non-toxic
19.	91.408	1.241	-2.978	0.526	0.272	Non-toxic
20.	91.674	1.204	-3.366	0.784	0.168	Non-toxic
21.	93.802	0.58	-3.62	-0.035	-0.734	Non-toxic
22.	93.183	1.393	-2.628	0.173	0.334	Non-toxic
23.	92.636	1.267	-2.749	0.383	0.075	Non-toxic
24.	89.356	1.436	-2.928	0.303	0.28	Non-toxic
SGI 1776	96.08	24.30	-2.735	0.662	1.18	Mutagenicity
AZ 1208	96.02	3.11	-2.699	1.168	0.82	Mutagenicity

a. Human intestinal absorption is the sum of bioavailability and absorption values evaluated from the ratio of cumulative excretion in urine, bile and feces; **b.** Caco-2 cells are derived from human colon adenocarcinoma and possess multiple drug transport pathways through the intestinal epithelium; **c.** skin permeability is a significant consideration for many consumer product efficacy, and of interest for the development of transdermal drug delivery; **d.** the steady state volume of distribution (vdss) is the theoretical volume that the total dose of a drug would need to be uniformly distributed to give the same concentration as in blood plasma; **e.** the ability of a drug to cross into the brain is an important parameter to consider to help reduce side effects and toxicities or to improve the efficiency of drugs whose pharmacological activity is within the brain.

Collectively and based on the estimated ligand efficiency, drug likeliness and pharmacokinetic predictors, the designed compounds considered as a pharmacologically active, which can be considered on progressing further potential hits.

Table 3. *In silico* predicted bioactivity properties of the designed oxindole derivatives

Compound code	GPCR ligand	Ion channel modulator	Kinase inhibitor	Nuclear receptor ligand	Protease inhibitor	Enzyme inhibitor
1.	-0.42	-0.86	-0.87	-0.92	-0.94	-0.28
2.	-0.34	-0.76	-0.79	-0.83	-0.78	-0.33
3.	-0.28	-0.75	-0.75	-0.78	-0.75	-0.19
4.	-0.24	-0.70	-0.59	-0.77	-0.71	-0.20
5.	-0.20	-0.87	-0.61	-0.69	-0.39	-0.21
6.	-0.21	-0.25	-0.19	-0.26	-0.52	0.00
7.	-0.15	-0.19	-0.06	-0.41	-0.45	0.21
8.	-0.23	-0.56	-0.48	-0.51	-0.47	-0.14
9.	-0.45	-0.81	-0.82	-0.78	-0.86	-0.36
10.	-0.38	-0.72	-0.75	-0.71	-0.72	-0.40
11.	-0.35	-0.71	-0.74	-0.70	-0.71	-0.29
12.	-0.33	-0.67	-0.63	-0.72	-0.70	-0.30
13.	-0.33	-0.82	-0.68	-0.70	-0.47	-0.29
14.	-0.27	-0.28	-0.24	-0.23	-0.50	-0.12
15.	-0.22	-0.23	-0.12	-0.36	-0.43	0.06
16.	-0.34	-0.55	-0.56	-0.53	-0.51	-0.25
17.	-0.40	-0.91	-0.83	-0.84	-0.91	-0.32
18.	-0.32	-0.82	-0.76	-0.76	-0.76	-0.38
19.	-0.28	-0.81	-0.73	-0.72	-0.73	-0.25
20.	-0.24	-0.75	-0.58	-0.72	-0.70	-0.26
21.	-0.23	-0.91	-0.63	-0.67	-0.41	-0.26
22.	-0.21	-0.33	-0.19	-0.22	-0.51	-0.06
23.	-0.15	-0.28	-0.06	-0.36	-0.44	0.14
24.	-0.24	-0.62	0.49	-0.49	0.48	-0.20
SGI 1776	-0.2	-0.27	-0.13	-0.2	-0.19	-0.21
AZ 1208	-1.26	-1.22	-0.75	-1.01	-1.33	-0.46

Abbreviations: GPCR: G protein-coupled receptor Ligand; ICM: Ion channel modulator; KI: Kinase inhibitor; NRL: Nuclear receptor ligand; PI: Protease inhibitor; EI: Enzyme inhibitor. For organic compounds, If the bioactivity score is (>0), then it is active, if (-5.0-0.0) then moderately active, if (<-5.0) then inactive.

Table 4. *In silico* predicted lipinski's properties of the designed oxindole derivatives

Compound code	M.W. g/mol	H.B. Don.	H.B. Acc.	Log P (o/w)	M.R. cm ³ /mol	TPSA Å ²	Lip. Vio.
1.	294.44	1	1	2.87	88.85	89.73	0
2.	292.42	1	1	2.78	90.66	89.73	0
3.	306.45	1	1	3.06	95.46	89.73	0
4.	321.46	1	2	1.87	102.27	92.97	0
5.	385.52	1	4	1.43	111.24	135.49	0
6.	288.39	1	1	2.99	85.50	91.42	0
7.	289.38	1	2	1.61	83.30	104.31	0
8.	328.45	2	1	2.65	98.83	98.52	0
9.	339.43	1	3	1.88	97.68	135.55	0
10.	337.42	1	3	1.79	99.48	135.55	0
11.	351.44	1	3	2.08	104.28	135.55	0
12.	366.46	1	4	0.88	111.10	138.79	0
13.	429.53	1	5	0.44	118.06	178.07	0
14.	333.39	1	3	2.00	94.33	137.24	0
15.	334.37	1	4	0.63	92.12	150.13	0

Table 4 (continued). *In silico* predicted lipinski's properties of the designed oxindole derivatives

16.	373.45	2	3	2.63	107.65	144.34	0
17.	308.46	1	1	3.32	93.82	89.73	0
18.	306.45	1	1	3.23	95.62	89.73	0
19.	320.47	1	1	3.52	100.43	89.73	0
20.	335.49	1	2	2.32	107.24	92.97	0
21.	399.55	1	4	1.88	116.20	135.49	0
22.	302.41	1	1	3.44	90.47	91.42	0
23.	303.40	1	2	2.07	88.26	104.31	0
24.	342.48	2	1	3.10	103.79	98.52	0
SGI 1776	405.42	1	7	4.27	107.95	54.68	0
AZ 1208	221.28	1	2	2.42	65.26	71.47	0

Molecular Docking

The designed compounds were docked against the human PIM1 (PDB ID: 3BGQ) to predict their binding mode. The compounds were found to have binding energies in the range of -7.20 to -9.70 kcal/mol were illustrated in Table 5. They formed 1–3 hydrogen bonds with LEU 44, LYS 67, GLU 121 and ASP 186 amino acids in the active site. In addition, different hydrophobic interactions were also observed including pi-sigma, pi-pi stacked, pi-alkyl, and alkyl types with LEU 174, ILE 185, LEU 120, ALA 65, ARG 122 and PHE 49 are shown in Figure 2. Among the series, compound 16 and compound 24 are showed equivalent dock score values (-9.7 kcal/mol) which are comparable to reference compounds AZD1208 and SGI1776. Overall results demonstrating, dithiocarbamate with aromatic ring as a side chain at third position and electron withdrawing (nitro) or electron releasing (methyl) on oxindole ring important for PIM1 Kinase inhibition activity.

Table 5. Binding energies and interactions between human PIM1 (PDB ID: 3BGQ) and designed oxindole derivatives

Ligand	Hydrogen bond Interactions	Hydrophobic Interaction	Dock score values (kcal/mol)
1.	NIL	ILE:104, ALA:65	-7.2
2.	GLU:121, GLU:171.	LEU:120, ILE:104, PHE:49, ILE:185, ALA:65, ILE:104, LEU-120, PHE:49, ILE:185, ARG:122, LEU:174, ASP:128, GLU:171, ASN:172, VAL:52, ASP:186, LYS:67	-8.1
3.	GLU:121	No Interactions	-8.4
4.	GLU:121, GLU:171, ASN:172	LYS:67, ILE:104, LEU:120, ILE:185, PHE:49, ILE:104, LYS:67, LEU:120, ILE:185, ASP:128, LEU:4 4, PRO:123, LEU:174, VAL:52, ARG:122, ALA:65, PHE:49, ASN:172, ASP:186, GLU: 89	-7.9
5.	GLU:121, GLU:171.	No Interactions	-8.1
6.	GLU:171	VAL:52, ILE:104, LEU:120, ALA:65, ILE:185	-7.8

Table 5 (continued). Binding energies and interactions between human PIM1 (PDB ID: 3BGQ) and designed oxindole derivatives

7.	LYS:67, ASP18	LEU:120, ILE:104, VAL:52, LEU:174, ALA:65, ILE:185	-7.5
8.	GLU:121	ILE:104, LEU:120, ALA:65, ILE:185	-9
9.	GLU:121, LYS:67, ASP:186	ALA:65, LEU:120, ILE:185, PHE:49, VAL:52, ILE:104	-7.9
10.	GLU:121, LYS:67, ASP:186	ILE:185, VAL:52, LEU:120, ALA:65, PHE:49, ILE:104	-8.6
11.	ASP:186, LYS:67	ALA:65, ILE:185, VAL:52, PHE:49, LEU:120, ILE:104	-9.1
12.	GLU:121, LYS:67 ASN:172, ASP:186	ILE:104, ILE:185, PHE:49, ALA:65, LEU:120, VAL:52	-8.7
13.	ASP:186, GLU:121, LYS:67	LEU:120, ILE:185, ILE:104, ALA:65, VAL:52	-8.7
14.	GLU:121, LYS:67, ASP:186	LEU:120, ILE:104, ALA:65, VAL:52, ILE:185	-8.4
15.	GLU:121, ASP:186, LYS:67	ILE:104, LEU:120, ILE:185, ALA:65, VAL:52	-7.9
16.	GLU:121, LYS:67, ASP:18, GLU:121.	ILE:185, ALA:65, VAL:52, ILE:104, LEU:120	-9.7
17.	GLU:121	VAL:52, ILE:104, LEU:120, ALA:65 PHE:49, ILE:185	-7.6
18.	GLU:121, GLU:171	PHE:49, ILE:104, VAL:52, ALA:65, LEU:120, ILE:185	-8.6
19.	GLU:121	PHE:49, ILE:104, ILE:185, VAL:52, ALA:65, LEU:120	-9
20.	ASP:186, GLU:121, GLU:171, ASN:172,	ILE:104, ILE:185, PHE:49, LEU:120, ALA:65, VAL:52	-8.6
21.	GLU:121, GLU:171	ILE:104, ILE:185, LEU:120, VAL:52, ALA:65	-8.7
22.	GLU:121, GLU:171	VAL:52, ALA:65, ILE:104, LEU:120, ILE:185	-8.6
23.	GLU:121, GLU:171	ILE:104, ALA:65, LEU:120, ILE:185	-8.2
24.	GLU:121	ALA:65, LEU:120, ILE:104, VAL:52, ILE:185	-9.7
SGI-1776	LYS:67, GLU:121, ASP:128, GLU:171	ILE:185, ILE:104, LEU:120, ALA:65, VAL:52, PHE:49, LEU:44, ARG:122, LEU:174, ILE:185, LEU:120.	-10.1
AZD-1208	LEU:44	VAL:52, ALA:65, ARG:122, LEU:174, VAL:126, LEU:44, LEU:174, LEU:120, ILE:185, LYS:67	-9.7

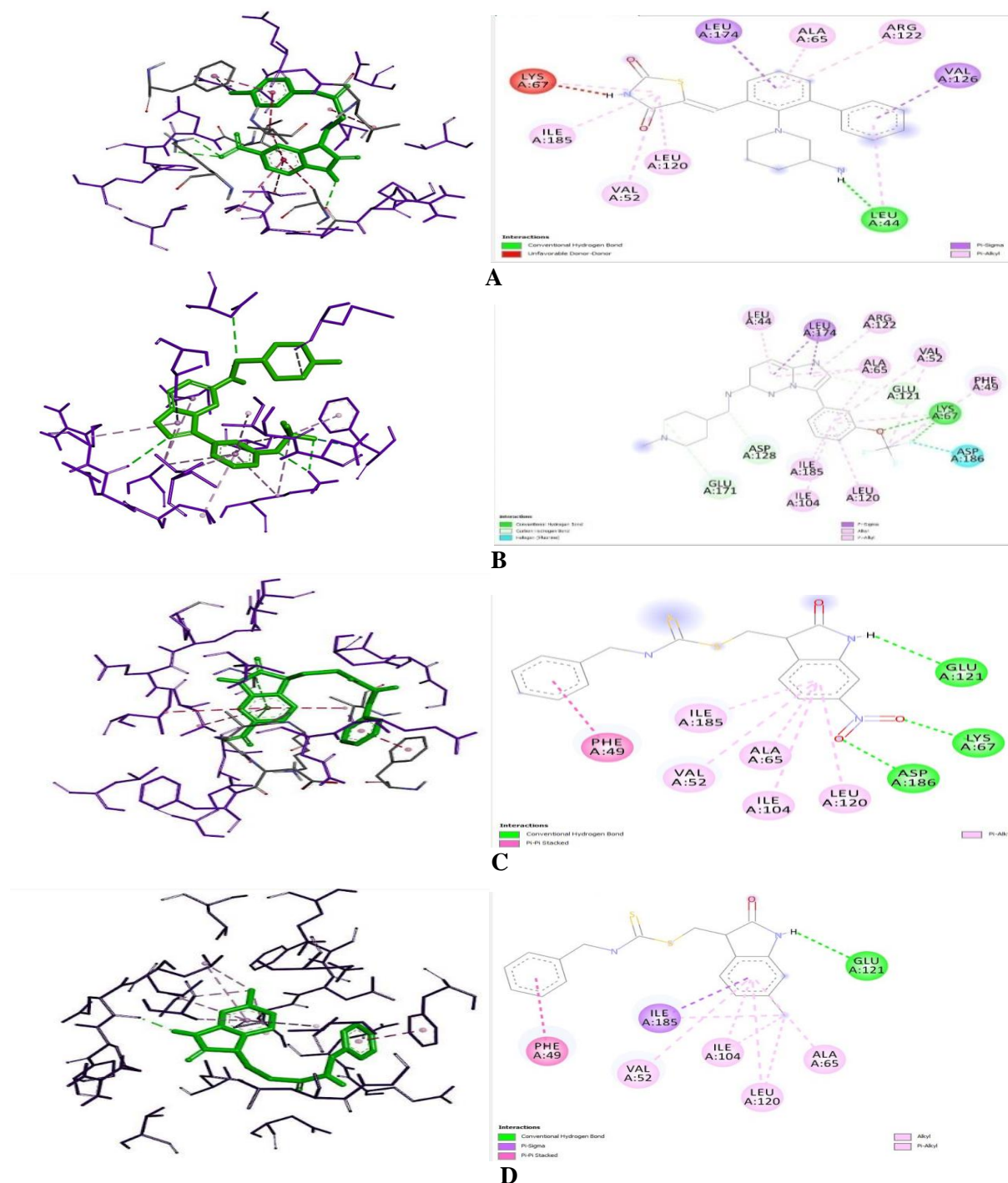


Figure 2. The 3D and 2D docking mode of ligands (A) AZD1208 (B) SGI1776 (C) Compound 16 (D) Compound 24, into PIM1 Kinase (pdb code: 3BGQ) showing hydrogen bonds (—), hydrophobic interactions (— — —)

PIM (Pro-viral integration site in Moloney murine leukemia virus) kinases are a family of serine/threonine protein kinases that are identified as unique molecular targets in oncogenesis and highly expressed in numerous human cancers. In connection with literature, a new series of 2-oxindole based

dithiocarbamate derivatives was designed and performed *in silico* experiments. The drug-likeness assessment analysed with Molinspiration, Molsoft, Swiss ADME and pkCSM softwares, which elucidated their full compliance with Lipinski's rule, physicochemical properties and pharmacokinetic parameters. Further molecular docking study showed good binding energy for all the compounds with the human target protein PIM1 (3BGQ). Overall, the ligands 16 and 24 exhibited the equivalent binding energies of -9.7 kcal/mol when compared to known reference compound AZD1208 (-9.7 kcal/mol). These results suggested that this study will help in designing of novel derivatives of dithiocarbamate substituted 2-oxindole in discovery of new chemical entities for anticancer therapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the Principal and Management of Sarojini Naidu Vanitha Pharmacy Maha Vidhyalaya, Osmania University, Hyderabad, India, for providing research facilities.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: *S.J.T.*; Design: *M.S.S.*; Control: *S.J.T.*; Sources: *S.J.T.*; Materials: -; Data Collection and/or processing: *D.A., D.K.B., S.B., P.C.*; Analysis and/or interpretation: *P.C., J.C.*; Literature review: *D.A., D.K.B., S.B., P.C., J.C.*; Manuscript writing: *M.S.S., D.A., D.K.B., S.B., P.C., J.C., S.J.T.*; Critical review: *M.S.K., S.J.T.*; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

The authors declare that the ethics committee approval is not required for this study.

REFERENCES

1. Zhang, X., Song, M., Kundu, J.K., Lee, M.H., Liu, Z.Z. (2018). PIM Kinase as an executional target in cancer. *Journal of Cancer Prevention*, 23(3), 109–116. [\[CrossRef\]](#)
2. Tursynbay, Y., Zhang, J., Li, Z., Tokay, T., Zhumadilov, Z., Wu, D., Xie, Y. (2016). PIM kinases as cancer drug target: An update (Review). *Biomedical Reports*, 4(2), 140-146. [\[CrossRef\]](#)

3. Saurabh, K., Scherzer, M.T., Shah, P.P., Mims, A.S., Lockwood, W.W., Kraft, A.S. (2014). The PIM family of oncoproteins: small kinases with huge implications in myeloid leukemogenesis and as therapeutic targets. *Oncotarget*, 5, 8503–8514. [CrossRef]
4. Asati, V., Mahapatra, D.K., Bharti, S.K. (2019). PIM kinase inhibitors: Structural and pharmacological perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 172, 95-108. [CrossRef]
5. Harshita, P.S., Soma Yasaswi, P., Jyothi, V., Saritha Jyostna, T. (2020). PIM-1 kinase: a novel target for cancer chemotherapy-a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(6), 1000-1011. [CrossRef]
6. Roskoski, R., Sunitinib, A. (2007). VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356(2), 323–328. [CrossRef]
7. Clinical trials web site. From <https://www.clinicaltrials.gov/>
8. Baig, M.H., Ahmad, K., Adil, M., Khan, Z.A., Khan, M.I. (2014). Drug discovery and in silico techniques: A mini-review. *Enzyme Engineering*, 4(1), 123. [CrossRef]
9. Daina, A., Michielin, O., Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(3), 427-417. [CrossRef]
10. Abagyan, R.A., Totrov, M.M., Kuznetsov, D.N. (1994). ICM - a new method for protein modeling and design. Applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation. *Journal of Computational Chemistry*, 15(5), 488-506. [CrossRef]
11. Molinspiration Cheminformatics free web site. From <https://www.molinspiration.com/>
12. Pires, E.V.D., Blundell, L.T., Ascher, B.D. (2015). pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(9), 4066–4072. [CrossRef]
13. Klejborowska, G., Urbaniak, A., Maj, E., Preto, J., Moshari, M., Wietrygk, J., Tusuzynski, J.A., Chambers, T.C., Huczyriski, A. (2020). Synthesis and biological evaluation and molecular docking studies of new amides of 4- chlorothiocolchicine as anticancer agents. *Bioorganic Chemistry*, 97, 103664. [CrossRef]
14. Agata, S., Tomasz, P., Joanna, S., Paweł, S., Aleksandra, S. (2014). Molecular properties prediction, docking studies, and antimicrobial screening of 1,3,4-thiadiazole and s-triazole derivatives. *Current Computer-Aided Drug Design*, 10(1), 3-14. [CrossRef]
15. Farrang, A.M., Ibrahim, M.H., Mehany, A.B.M., Ismail, M.M.F. (2020). New cyanopyridine based scaffold as PIM1 inhibitors and apoptotic inducers: Synthesis and SARs study. *Bioorganic Chemistry*, 105, 104378. [CrossRef]
16. Protein Data Bank (PDB) web site. From <https://www.rcsb.org>
17. Pharmit: interactive exploration of chemical space web site. From <https://pharmit.csb.pitt.edu>.
18. AutoDockVina. v.1.2.0, the free GUI for AutoDock Vina web site. From <http://autodock.scripps.edu/>

19. Muni Sireesha, S., Dipankar, B., Soujanya, D., Brijitha, G., Jyothi, V. (2021) Computational validation of tacrine analogs as antialzheimer's agents against acetylcholinesterases. *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences*, 10(10), 243-254. [\[CrossRef\]](#)



DETERMINATION OF *UREAPLASMA UREALYTICUM* AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY IN SEXUALLY ACTIVE WOMEN WITH DIFFERENT METHODS

*CİNSEL YÖNDEN AKTİF KADINLARDA UREAPLASMA UREALYTICUM VE
ANTİBİYOTİK DUYARLILIĞININ FARKLI YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ*

Şükran ÖZTÜRK^{1*} , Sulhiye YILDIZ² 

¹Zonguldak Bulent Ecevit University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical
Microbiology, 67600, Zonguldak, Turkey

²Lokman Hekim University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology,
06510 Ankara, Turkey

ABSTRACT

Objective: In this study, the presence of *Ureaplasma urealyticum* (*U.urealyticum*) in vaginal and urine samples taken from sexually active women was investigated and antibiotic susceptibilities were determined with culturing bacteria and using kits.

Material and Method: The vaginal and urine samples taken from 110 women who applied to Başkent University Ankara Gynecology and Obstetrics Clinic were included in this study. *U. urealyticum* was investigated by the culture method with using two different test kits [*Mycoplasma IES* (*IES-Autobio*, China) and *Mycoplasma IST2* (*IST2*) *Biomereux*, France] and *Mycoplasma Agar*. Antibiotic susceptibilities of isolates were also determined.

Result and Discussion: We compared the results of (*IES*) and (*IST2*) used for *U. urealyticum* detection in 220 clinical samples. *U. urealyticum* was found to be positive in 82 (74,5%) by classical culture method. *U. urealyticum* was detected at a rate of 46.8% with the *IST 2* and 53.6% with the *IES*. As a result of the comparison of culture method and commercial kits, it was determined that the *IES* kit provides a fast and accurate identification in the detection of *U.urealyticum*, a fast and reliable result in the detection of antibiotic resistance. A significant difference was found in the detection rate of *U. urealyticum* of the *IES* compared to the other commercial kit. It was observed that the detection rate of *U. urealyticum* with the kit from vaginal were significantly higher than urine samples.

Keywords: Antibiotic susceptibility, commercial kit, culture, *U. urealyticum*

* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Şükran Öztürk
e-mail / e-posta: sukranozturk79@gmail.com, Phone / Tel.: +905056652387

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada, cinsel yönden aktif kadınlardan alınan vajinal ve idrar örneklerinde *Ureaplasma urealyticum* (*U.urealyticum*) varlığı, kültür ve kitlerle araştırılmış, ticari kitler kullanılarak da antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Başkent Üniversitesi Ankara Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'ne başvuran 110 kadından alınan vajinal ve idrar örnekleri ile çalışma gerçekleştirilmiştir. *U. urealyticum*'un *Mycoplasma IES* (*IES-Autobio, China*) ve *Mycoplasma IST2* (*IST2- Biomereux, Fransa*) olarak bilinen iki farklı test kiti ile tespiti yapılmış ve antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. Ayrıca *Mycoplasma Agar* kullanılarak kültür yöntemiyle de varlığı araştırılmıştır.

Sonuç ve Tartışma: *U. urealyticum* tespiti için 220 klinik örnek kullanılmıştır. *IES* ve *IST2* ticari kitleri kullanılarak yapılan tespit sonuçları ile *Mycoplasma Agar* besiyeri kullanılarak klasik kültür yöntemi ile yapılan çalışma sonuçları karşılaştırılmıştır. Buna göre; kültür yöntemiyle 82 (%74,5) hastada *U. urealyticum* pozitif bulunmuş olup, *U.urealyticum*, *IST 2* ile %46,8, *IES* ile (%53,6) oranında tespit edilmiştir. Kültür yöntemi ile ticari kitlerin karşılaştırılması sonucunda, *IES* kitinin *U. urealyticum* tespitinde ve antibiyotik duyarlılıklarının saptanmasında hızlı ve doğru bir tanımlama sağladığı sonucuna varılmıştır. *IES* kitinin *U. urealyticum* tespit oranında diğer ticari kite göre anlamlı derecede iyi tespit yaptığı ortaya konmuş olup, vajinal örneklerden *U. urealyticum* tespit oranının, idrar örneklerinden anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik duyarlılığı, kültür, ticari kit, *U. urealyticum*

INTRODUCTION

Mycoplasma is a bacteria without a cell wall and has the smallest cells among prokaryotes and self-copying. They can be cultured *in vitro* in a medium having both RNA and DNA and live as both parasites and saprotrophs. [1]. *Ureaplasma urealyticum* (*U. urealyticum*) is potentially pathogenic bacterial species that usually associated with urogenital and respiratory system diseases, sexually transmitted and have no peptidoglycan cell wall. Hence, they are found to be responsible of infertility, prematurity, recurrent abortus and newborn respiratory distress. In some studies, *U. urealyticum* has been shown as one of the factors of infertility seen in men [2]. Laboratory diagnosis of them is relatively complicated since they are very sensitive microorganisms and they require special transport and culture media. Since the infections caused by these microorganisms exhibit importance, proper isolation and identification of these bacteria are required to make proper and reliable [3,4].

The aim of this study was to determine the rate of *U. urealyticum* from vaginal and urinary samples obtained from 110 sexually active women from Başkent University Ankara Hospital Obstetrics and Gynecology Clinic. Also to compare the results and detection ability of different clinical methods including culture method with *Mycoplasma agar* media, commercially available kit methods *Mycoplasma IST 2* and *Mycoplasma IES*.

MATERIAL AND METHOD**Study Design and Sample Collection**

We used two commercially available diagnostic kits; Mycoplasma IES (IES) and Mycoplasma IST-2 (IST-2). *U. urealyticum* ATCC 27618 strain was used as control.

A total of 220 clinical samples consist of 110 urine and 110 vaginal were included in the study. These samples were collected from 110 sexually active women in Obstetrics and Gynecology Clinic, Başkent University Ankara Hospital, Ankara, Turkey. All samples were analyzed by the classical culture method and two commercial diagnostic kits method. The vaginal samples were collected with steril cotton swaps and urinary samples with steril container. Then samples were transferred to suitable diluent vial (supplied with the diagnostic kits) that contains selective agents to inhibit the growth of other microbes present in the sample and transported in a suitable medium that containing urea/ arginine diluent supplied with the Mycoplasma IST-2 and Mycoplasma IES diagnostic kits, stored either at 4 °C for culture. For the detection of *U. urealyticum* in the samples, *in-vitro* culture, and diagnostic kit methods were used. If the presence of *U. urealyticum* detected by the culture method, it was confirmed by the two commercial kits. Included in the kit content, the sensitivity of the samples to various antibiotics was also determined. The susceptibility strip contained 11 antibiotics (Pristinamycin (PRI), Minocycline (MIN), Roxithromycin (ROX), Clindamycin (CLI), tetracycline (TET), josamycin (JOS), Ofloxacin (OFL), ciprofloxacin (CIP), clarithromycin (CLA), erythromycin (ERY) and Levofloxacin (LEV)) in IES kit and 9 antibiotics in IST-2 kit (Pristinamycin (PRI), doxycycline (DOT), tetracycline (TET), josamycin (JOS), Ofloxacin (OFL), ciprofloxacin (CIP), clarithromycin (CLA), erythromycin (ERY) and azithromycin (AZI)).

Culture Methods

Mycoplasma Agar Medium (MAM) (CM0401, Oxoid) is a basic medium that can be used for the isolation and cultivation of mycoplasmas from clinical specimens after enrichment with a supplement. MAM was used for the detection of *U. urealyticum* by classical culture method. In 1 L of distilled water 35.5 g agar were dissolved and distribute in 80 mL volumes. Sterilized by autoclaving at 121 °C for 15 min. Cool to 50 °C and one vial of Mycoplasma Supplement-G SR0059 (Oxoid) reconstituted were added to sterilized medium as directed. *Mycoplasma* species are grown at pH 7.4-8.0, but *U. urealyticum* (T-strains)* prefer pH 6.0-6.5 for growing in Mycoplasma Agar [5]. *Mycoplasma spp.* colonies were expected to appear by tissue culture microscopy as typical fried egg [6,7].

Kits Methods (IES and IST-2)

Vaginal and urine samples, collected by the suitable technical, were inoculated to the two different commercial kits: IES and IST-2.

The kits were used for the identification, detection, enumeration, and antimicrobial susceptibility testing of *U. urealyticum* in the samples following to the manufacturer's instructions. The kit reagents were mixed with the samples and incubated at 36–38 °C for 24–48 h. At the end of the incubation period, the color change of the medium from yellow to deep pink was considered positive for *U. urealyticum*.

The IST-2 kit contains R1 (transport medium) and R2 (selective growth medium) tubes. All samples were collected with sterile swab. Swabs were taken into the liquid transport medium R1 and delivered to the clinical laboratory within 4 h of collection for the identification of *U. urealyticum*. R1 swabs were transferred to the R2 medium after vortexed for 10 sec. Then the R2 medium was then dispensed into wells to detect the presence of mycoplasmas and the wells were overlaid with mineral oil to prevent drying. The kits were incubated at 37 °C for 48 h and observed for any color change at 24 h and 48 h. The color alteration from yellow to orange in the culture medium is related to an increase in pH and remarks growth of mycoplasmas. The determination of orange to red color of the antimicrobial susceptibility well shows the resistance of mycoplasmas to an antimicrobial agent. From the R2 positive tube, 0.1 mL was also inoculated onto Mycoplasma agar medium with Supplement G (Oxoid). Three hundred µL of the inoculation suspension was transferred into the medium. Then, the suspension (100 µL) was inoculated into the wells of the strip. Each strip well was covered by mineral oil. The incubation period was applied at 37 °C for 24 h. The appearance of red color indicated positive reaction and microbial growth.

In addition, all samples were inoculated on blood agar. To determine that the *Proteus spp.* for differentiate from *U. urealyticum* and to reveal the status of interference with *Proteus spp* colonies cultured on blood agar. All positive samples were confirmed as *U. urealyticum*.

Statistical Analysis

The suitable sample size was determined on the basis of the kappa statistics for power of test 0.80. Descriptive statistics were presented as frequency and percentages for categorical variables (Table 2).

For the determination the effect of independent variables on the *U. urealyticum* asset that a generalized estimating equation (GEE) was used. Positive predictive value, negative predictive value, sensitivity, and specificity values were calculated for IES, IST-2 by agar culture data. In addition, for the samples (164 positive), the relationship between the results of the vaginal and urinary samples obtained with the IES and IST-2 kits was analyzed by chi-square test. Significance level (α) of the tests was accepted to be $p < 0.05$. The SPSS software, version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), and R 3.4.2 [<https://www.r-project.org/>] were used for statistical analyses.

RESULT AND DISCUSSION

A total of 110 sexually active women (urine and vaginal, a total of 220 samples) were included in this study and *U. urealyticum* was detected positive with Mycoplasma agar plates in 82 (74,5%) patients. One hundred and three positive results was detected in 220 samples (46,8%) as *U. urealyticum* by Mycoplasma IST 2 kit and 118 positives in 220 samples (53,6%) by Mycoplasma IES kit. The

antibiotic resistance rates of isolates were evaluated by using the Mycoplasma IES assay as 3% for levofloxacin, 19% for erythromycin, 20% for tetracycline, and 6% for ciprofloxacin. With the Mycoplasma IST 2 assay resistance rates were 17% to tetracycline, 9% to ciprofloxacin, 11% to erythromycin. All isolates were found susceptible to pristinamycin, josamycin, and doxycycline.

The Mycoplasma IES kit was found to be accomplished compared to other commercial culture-based assays for a rapid and accurate identification of *U. urealyticum* and detection of resistance. Also, the detection rates of *U. urealyticum* was found higher in vaginal specimens than urine samples (Table 1).

Table 1. Distribution of positive specimens by origin and kit types

Sample Type	IES		IST-2		Culture	
	positive	negative	positive	negative	positive	negative
Vaginal (110)	67(61%)	15 (14%)	58(53%)	24 (22%)	82(74%)	0
Urine (110)	51(46%)	31(28%)	45(41%)	37 (34%)	82(74%)	0
Total (220)	118(54%)	46 (21%)	103(47%)	61 (28%)	164(74%)	0

Diagnostic test evaluation results according to sample types are shown in Table 2. When the results are evaluated; For IST 2 and IES methods, vaginal sample sensitivity, NPV and accuracy values are higher than urine sample values.

Table 2. Diagnostic test evaluation IST-2, IES and agar culture by sample type

Statistic	IST 2	IES	Agar Culture
Sensitivity (VS)	88.89%	97.22%	100.00%
Sensitivity (US)	55.56%	63.89%	100.00%
Specificity (VS)	100.00 %	100.00 %	100.00%
Specificity (US)	100.00 %	100.00 %	100.00%
Positive Predictive Value (PPV) (VS)	100.00 %	100.00 %	100.00%
Positive Predictive Value (PPV) (US)	100.00 %	100.00 %	100.00%
Negative Predictive Value (NPV) (VS)	94.87%	98.67 %	100.00%
Negative Predictive Value (NPV) (US)	82.22 %	85.06 %	100.00%
Accuracy (VS)	96.36%	99.09%	100.00%
Accuracy (US)	85.45%	88.18%	100.00%

*VS: Vaginal Sample *US: Urine Sample

Diagnostic test evaluation results according to kit types were shown in Table 3. The results were evaluated IES of sensitivity, NPV and accuracy values 80.56%, 91.36%, 93.64% respectively. IST 2 of sensitivity, NPV and values 72.22%, 88.10%, 90.91% respectively. IES method has higher sensitivity and accuracy value than IST 2 method. The concordance of IST 2 and IES methods with agar culture method was examined with kappa coefficient. The kappa coefficients were found to be statistically significant and high fit, respectively (0.778, $p < 0.001$; 0.848, $p < 0.001$).

Antibiotic Susceptibility of the *U. urealyticum* Isolates with IST-2 Kit

Samples were also evaluated with IST-2 kit for antibiotic susceptibilities. The greatest sensitivity among all strains was 100% against pristinamycin (PRI), josamycin (JOS), and doxycycline (DOT). The resistance rates were; 11% to erythromycin (ERY), 83% to tetracycline (TET), and the highest resistance was found to ciprofloxacin (CIP) 91% (Table 4). Minimal inhibition concentrations (MICs) were performed according to CLSI guidelines (tests repeated two times). MICs were interpreted according to the IST 2 kit criteria (see the legend to Table 4) [3,8].

Table 3: Diagnostic test evaluation, IST- 2, IES and Agar Culture

Statistic	IST2	IES	Agar Culture
Sensitivity	72.22%	80.56%	100.00%
95%CI for Sensitivity	60.41% to 82.14%	69.53% to 88.94%	95.01%–100.00%
Specificity	100.00 %	100.00 %	100.00%
95%CI for Specificity	97.54% to 100.00%	97.54% to 100.00	97.54%–100.00%
Positive Predictive Value (PPV)	100.00 %	100.00 %	100.00%
Negative Predictive Value (NPV)	88.10 %	91.36 %	100.00%
95%CI for NPV	83.60% to 91.48%	86.85% to 94.42%	100.00%
Accuracy	90.91%	93.64%	
95%CI for Accuracy	86.31% to 94.36%	89.55% to 96.48%	98.34%–100.00%

Table 4. Antimicrobial susceptibilities of the *U. urealyticum* isolates with IST-2 kit and MIC values ($\mu\text{g/mL}$)

	<i>U. urealyticum</i> (n ¹ =82)		MIC ($\mu\text{g/mL}$)	
	S	R	S	R
Doxycycline (DOT)	82(100.0)	0(0)	≤ 4	≥ 8
Josamycin (JOS)	82(100.0)	0(0)	≤ 2	≥ 8
Ofloxacin (OFL)	60(72.5)	22(27.5)	≤ 1	≥ 4
Erythromycin (ERY)	73(88.9)	9(11.1)	≤ 1	≥ 4
Tetracycline (TET)	68(83.0)	14(17.0)	≤ 4	≥ 8
Ciprofloxacin (CIP)	75(91.0)	7(0.9)	≤ 1	≥ 2
Azithromycin (AZI)	63(76.5)	19(15.6)	≤ 0.12	≥ 4
Clarithromycin (CLA)	69(84.3)	13(10.7)	≤ 1	≥ 4
Pristinamycin (PRI)	82(100.0)	0(0)	≥ 2	

Mycoplasma IST 2 kit (bioMérieux). *U. urealyticum*, *Ureaplasma urealyticum*; S, susceptible; I, intermediate; R, resistant. n¹=82 (patient). Results are n (%). The breakpoints ($\mu\text{g/mL}$) according to the Clinical and Laboratory Standards Institute are as follows: Tetracycline S ≤ 4 , R ≥ 8 ; Doxycycline S ≤ 4 , R ≥ 8 ; Azithromycin S ≤ 0.12 , R ≥ 4 ; Clarithromycin S ≤ 1 , R ≥ 4 ; Erythromycin S ≤ 1 , R ≥ 4 ; Josamycin S ≤ 2 , R ≥ 8 ; Ciprofloxacin S ≤ 1 , R ≥ 2 ; Ofloxacin S ≤ 1 , R ≥ 4 ; Pristinamycin R ≥ 2 .

Antibiotic Susceptibility of the *U. urealyticum* Isolates with IES Kit

The antibiotic susceptibilities of microorganisms were also evaluated by IES kit. Accordingly, all strains showed greatest sensitivity to pristinamycin (PRI) with 100% rate, tetracycline (TET) sensitivity was followed this result with 80%, and 95% rate was found to josamycin (JOS). The highest antibiotic resistance was seen 97% to levofloxacin (LEV), 100% to clindamycin (CLI), 94% to ciprofloxacin (CIP), and 51% to roxithromycin (ROX). The resistance to erythromycin (ERY) (81%) and

clarithromycin (CLA) (32%). (Table 5). MICs were performed according to CLSI guidelines (tests repeated two times). MICs were interpreted according to the IES kit criteria (see the legend to Table 5) [8].

Table 5. Antibiotic susceptibility of the *U. urealyticum* isolates with IES kit: MIC ($\mu\text{g/mL}$)

	<i>U.urealyticum</i> (n ¹ =82)		MIC ($\mu\text{g/mL}$)	
	S	R	S	R
Pristinamycin (PRI)	82(100.0)	0(0)	≥ 2	
Minocycline (MIN)	56(68.5)	26(31.5)	≤ 2	≥ 8
Josamycin (JOS)	78(95.0)	4 (5.0)	≤ 2	≥ 8
Erythromycin (ERY)	66(81.0)	16(19.0)	≤ 8	≥ 16
Roxythromycin (ROX)	60(74.0)	22(26.0)	≤ 1	≥ 4
Clindamycin (CLI)	0(0.00)	82(100.0)	≤ 0.25	≥ 0.5
Ofloxacin (OFL)	56(68.7)	26(31.3)	≤ 1	≥ 4
Ciprofloxacin (CIP)	77(94.0)	5(6.0)	≤ 1	≥ 2
Clarythromycin (CLA)	56(68.0)	26(32.0)	≤ 1	≥ 4
Tetracycline (TET)	66(80.0)	16(20.0)	≤ 1	≥ 2
Levofloxacin (LEV)	59(72.0)	23(28.0)	≤ 2	≥ 4

Mycoplasma IES kit (Autobio).*U.urealyticum*, *Ureaplasma urealyticum*; S, susceptible; I, intermediate; R, resistant. n¹=82 (patient). Results are n (%). The breakpoints ($\mu\text{g/mL}$) according to the Clinical and Laboratory Standards Institute are as follows: Tetracycline S ≤ 1 , R ≥ 2 ; Minocycline S ≤ 2 , R ≥ 8 ; Roxythromycin S ≤ 1 , R ≥ 4 ; Clarythromycin S ≤ 1 , R ≥ 4 ; Erythromycin S ≤ 8 , R ≥ 16 ; Josamycin S ≤ 2 , R ≥ 8 ; Ciprofloxacin S ≤ 1 , R ≥ 2 ; Ofloxacin S ≤ 1 , R ≥ 4 ; Clindamycin S ≤ 0.25 , R ≥ 0.5 ; Levofloxacin S ≤ 2 , R ≥ 4 ; Pristinamycin R ≥ 2 . (30).

Mycoplasmas are microorganisms that can be in the oral and genital system of humans but can form a disease with the effect of certain factors. The most common mycoplasmas isolated from the urogenital system are *M. hominis* and *U. urealyticum* in many studies [9].

Ureaplasmas have also been consistently associated with Nongonococcal Urethritis (NGU) and pregnancy complications [10]. *U. urealyticum* is an opportunistic pathogen in humans and can often be isolated from the genitourinary system of young women, causing diseases such as acute urethritis, bacterial vaginitis, pelvic inflammatory disease, and pyelonephritis. It can cause miscarriage in pregnant women and chorioamnionitis and congenital pneumonia in infants, and it can be isolated from the fetus and cerebrospinal fluid. It is also known to cause infertility in women [11,12].

It has become a necessity to use effective and rapid diagnostic methods to control these infections and reduce their complications because of the pathogenic role of ureaplasmas is increasing [12, 13]. *Mycoplasma* IES and *Mycoplasma* IST-2 kits are commercial test kits that are used for *Ureaplasma spp.* detection and give faster results compared to the culture method.

In this study, it was found that the sensitivity of the IES kit was higher than the IST-2 kit, and the sensitivity rates were found to be 80.56% and 72.22%, respectively. Regarding antibiotic sensitivity, the conformity rate between *Mycoplasma* IES and Mycofast Revolution has been reported as 100% [14, 15]. In our study, the concordance rate between IES and IST 2 was determined as 100% for both samples

and it is compatible with the study data. Similarly, D'Inzeo et al. (2017) compared the sensitivities of Mycoplasma IES, Mycoplasma IST 2 and Mycofast, and they found the sensitivity results as 100%, 95.3% and 96.2%, respectively, and reported the highest result for Mycoplasma IES [13]. In a study by Kusanovic et al. (2020), the sensitivity of Mycoplasma IES, MYCOFAST Revolution and Mycoplasma IST 2 kits was determined as 100%, 96 and 95% for *U. urealyticum*, respectively, and it is consistent with the results we obtained from this study [16].

The *U. urealyticum* detection rate was found to be 61% with IES, 52% with the IST-2 kit, and 74% with the culture method in our study. Skiljevic et al. (2016) reported the rate of detection of *U. urealyticum* in urethral and endocervical swab samples as 77.8% in their study with IST-2 and including 132 female patients [17]. In another study using IST-2; 9956 sample was included in the study, and 1856 of them were found to be positive. *U. urealyticum* was detected in 1652 patients (89%) among these positives [18]. In our study, *U. urealyticum* detection rate (52%) was found with the IST-2 kit, and it was concluded that this difference may be due to factors such as living conditions, socioeconomic status, and age.

The other aim of this study was to compare the effectiveness of commercial mycoplasma kits for different clinical samples including vaginal and urine. The results of the sensitivity study performed with different samples with these three methods were IES (97.22%), IST2 (88.89%) and culture method (100%) for vagina, while the data for urine were 63.89%, 55.56% and 100%. The rate of detecting *U. urealyticum* with the IES kit was significantly higher than the IST-2 kit for both samples ($p < 0.001$). In our literature survey, no study was found that determined these two kits in comparison with two different sample types.

In most clinical studies, it appears that the presence of *U. urealyticum* was usually determined by studying a single biological sample. It was concluded that the vaginal sample was a more suitable material for the detection of *U. urealyticum* than the urine sample, and no significant difference was found in the antibiotic sensitivity tables.

In our study, antibiotic resistance rates measured by IES were found to be ciprofloxacin, 6.0%, clindamycin 100%, levofloxacin 28.0%, ofloxacin 31.3%, tetracycline 20%, clarithromycin 32.0%, erythromycin 11.1%, minocycline 31.5% and roxithromycin 26%. Similarly, antibiotic resistance rates in Tuzemen et al. study (2017) with IES were reported as ciprofloxacin 84.65%, clindamycin 85.96%, levofloxacin 15.35%, ofloxacin 23.49%, tetracycline 19.42%, clarithromycin 12.6%, erythromycin 14.96%, minocycline 0.39% and roxithromycin 13.39% [12]. Longdoh et al. (2018) found *U. urealyticum* detection rate 78.57% in their study performed by IES kit from cervical specimens in pregnant women, and reported antibiotic susceptibilities as 72.4%, 93.1% and 41.3% for erythromycin, ciprofloxacin and tetracycline, respectively [19]. When these results were evaluated, it was seen that the sensitivity rates in the samples taken from the cervical swabs were similar.

Likewise, the results obtained from the studies conducted with IST-2 in the literature are compatible with our study. In the study conducted by Koh et al. (2009) with the IST2 kit, the antibiotic sensitivity rates were found to be tetracycline 81%, erythromycin 82.9%, ofloxacin 56.2% and pristinamycin 100% [20]. While Jang et al. (2019) in their studies, the sensitivities of *U. urealyticum* to doxycycline, erythromycin, ciprofloxacin and azithromycin were determined as 94.8%, 87.9%, 5.2% and 81%, respectively [21].

In the study performed by Skiljevic et al. (2016) with the IST2 kit, the resistance rate to erythromycin was determined as 83.8%, and it shows an inverse correlation with our resistance rate (11%) that we determined with the IST2 kit [17]. In other studies, conducted by Bayraktar et al. (2010) and Tüzemen et al. (2017) resistance rates against erythromycin are similar to our study with 22.2% and 14.36%, respectively [12, 22]. All these differences can be attributed to differences in the local use of antibiotics.

Recent studies support the use of commercially available kits for the diagnosis of *Ureaplasma spp.* The use of kits is preferred to determine the frequencies of *U. urealyticum* and *M. hominis* in urine and other biological samples as well as vaginal and endocervical fluid, and antibiotic susceptibility profiles, especially against tetracyclines and fluoroquinolones.

As a result, it was found that the detection rate of the culture method was superior to both kits and concluded that the detection rate of the IES kit was higher in both samples. The IES kit can be preferred over the IST2 kit, considering the high rate of detection, availability, and price. Our findings will be useful in terms of being guide on clinical studies to be conducted on *U. urealyticum*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the doctors and nurse at Baskent University Ankara Hospital for Obstetrics and Gynecology Clinic and Prof.Dr. Polat Dursun.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: Ş.Ö., S.Y.; Design: Ş.Ö.; Control: S.Y.; Sources: Ş.Ö.; Materials: Ş.Ö., S.Y.; Data collection and/or processing: Ş.Ö., S.Y.; Analysis and/or interpretation: Ş.Ö., S.Y.; Literature review: Ş.Ö., S.Y.; Manuscript writing: Ş.Ö., S.Y.; Critical review: Ş.Ö., S.Y.; Other: Ş.Ö., S.Y.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no real, potential, or perceived conflict of interest for this article.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

Ankara University Faculty of Medicine Clinical Research Ethics Committee. No: 12-500-13.
26.08.2013.

REFERENCES

1. Ozturk, S., Yildiz, S., Dursun, P., Yener Ilce, B., Kaymaz, O. (2019). *Mycoplasma hominis* profile in women: Culture, kit, molecular diagnosis, antimicrobial resistance, and treatment. *Microbial Pathogenesis*, 135, 103635. [\[CrossRef\]](#)
2. Song, T., Liu, Z., Zhang, Y., Han, Y., Huang, J. (2019). Detection of *Ureaplasma* spp. serovars in genital tract of infertile males. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 33(5), e22865. [\[CrossRef\]](#)
3. Lee, J.Y., Yang, J.S. (2020). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma Species* in nonpregnant female patients in South Korea indicate an increasing trend of pristinamycin-resistant isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(10), e1065-20. [\[CrossRef\]](#)
4. Miyoshi, Y., Suga, S., Sugimi, S., Kurata, N., Yamashita, H., Yasuhi, I. (2020). Vaginal *Ureaplasma urealyticum* or *Mycoplasma hominis* and preterm delivery in women with threatened preterm labor. *The Journal of Maternal-Fetal&Neonatal Medicine*, 1-6. [\[CrossRef\]](#)
5. Edward, D.G. (1954). The pleuropneumonia group of organisms: a review, together with some new observations. *Microbiology*, 10(1), 27-64. [\[CrossRef\]](#)
6. Altındış, M., Tanır, H.M. (2001). Vajinal akıntısı olan kadınlarda *Mycoplasma hominis* ve *Ureaplasma urealyticum* sıklığının ve antimikrobiyallere direnç durumlarının saptanması. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 58(1), 15-20.
7. Shepard, M.C., Lunceford, C.D. (1970). Urease color test medium U-9 for the detection and identification of "T" mycoplasmas in clinical material. *Applied Microbiology*, 20(4), 539.
8. Wayne, P. (2011). Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.
9. Zhao, F., Feng, X., Lv, P., Xu, X., Zhao, Z. (2020). Real-time PCR assay may be used to verify suspicious test results of *Ureaplasma* spp. from the liquid culture method. *Journal of Microbiological Methods*, 169, 105831. [\[CrossRef\]](#)
10. Frølund, M., Björnelius, E., Lidbrink, P., Ahrens, P., Jensen, J.S. (2014). Comparison between culture and a multiplex quantitative real-time polymerase chain reaction assay detecting *Ureaplasma urealyticum* and *U. parvum*. *PLoS One*, 9(7), e102743. [\[CrossRef\]](#)
11. Sleha, R., Boštíková, V., Hampl, R., Salavec, M., Halada, P., Štěpán, M., Novotná, Š., Kukla, R., Slehová, E., Kacerovský, M., Boštík, P. (2016). Prevalence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in women undergoing an initial infertility evaluation. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Immunologie*, 65(4), 232–237.

12. Tüzemen, N.Ü., Efe, K., Özakin, C. (2019). *Mycoplasma hominis* ve *Ureaplasma urealyticum*: Ürogenital Sistem İnfeksiyonlarındaki Yeri ve Antibiyotik Direnç Oranlarının Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi. *Klinik Dergisi*, 32(1), 40-45. [\[CrossRef\]](#)
13. D’Inzeo, T., De Angelis, G., Fiori, B., Menchinelli, G., Liotti, F.M., Morandotti, G.A., De Maio, F., Nagel, D., Antonaci, M., Sanguinetti, M., Spanu, T. (2017). Comparison of Mycoplasma IES, Mycofast Revolution and Mycoplasma IST2 to detect genital mycoplasmas in clinical samples. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 11(1), 98-101. [\[CrossRef\]](#)
14. Kilic, D., Basar, M.M., Kaygusuz, S., Yilmaz, E., Basar, H., Batislam, E. (2004). Prevalence and treatment of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Mycoplasma hominis* in patients with non-gonococcal urethritis. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 57(1), 17–20.
15. Nulens, E., Van Praet, J., Selleslag, D., Van Landschoot, T., Dekeyzer, D., Descheemaeker, P., Reynders, M. (2016). A disseminated *Mycoplasma hominis* infection in a patient with an underlying defect in humoral immunity. *Infection*, 44(3), 379–381. [\[CrossRef\]](#)
16. Kusanovic, J.P., Vargas, P., Ferrer, F., Díaz, F., Córdova, V., Martinovic, C., Valdés, R., Rosas, A., Luna, D., Silva, P., Silva, K., Nilo, M.E., Silva, M.J., Espejo, E., Zambrano, M.A., García, J., Parra-Lara, L.G., Escobar, M.F. (2020). Comparison of two identification and susceptibility test kits for *Ureaplasma* spp and *Mycoplasma hominis* in amniotic fluid of patients at high risk for intra-amniotic infection. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 33(20), 3409–3417. [\[CrossRef\]](#)
17. Skiljevic, D., Mirkov, D., Vukicevic, J. (2016). Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in genital samples collected over 6 years at a Serbian university hospital. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 82(1), 37–41. [\[CrossRef\]](#)
18. De Francesco, M.A., Caracciolo, S., Bonfanti, C., Manca, N. (2013). Incidence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* isolated in Brescia, Italy, over 7 years. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 19(4), 621–627. [\[CrossRef\]](#)
19. Longdoh, N.A., Gregory, H.E.E., Djeumako, W.A., Nguedia, A.J.C., Francois-Xavier, M.K., Tebit, K.E. (2018). The occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women in three district hospitals in Douala, Cameroon. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, 1-11. [\[CrossRef\]](#)
20. Koh, E., Kim, S., Kim, I.S., Maeng, K.Y., Lee, S. (2009). Antimicrobial susceptibilities of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in pregnant women. *Korean Journal of Clinical Microbiology*, 12(4), 159-162. [\[CrossRef\]](#)
21. Jang, Y.S., Min, J.W., Kim, Y.S. (2019). Positive culture rate and antimicrobial susceptibilities of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. *Obstetrics & Gynecology Science*, 62(2), 127-133. [\[CrossRef\]](#)
22. Bayraktar, M.R., Ozerol, I.H., Gucluer, N., Celik, O. (2010). Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(2), e90-95. [\[CrossRef\]](#)



NASTURTIIUM OFFICINALE’NİN FİTOKİMYASAL İÇERİĞİ, ANTIOKSİDAN VE ENZİM İNHİBİTÖR ETKİLERİ

PHYTOCHEMICAL CONTENT, ANTIOXIDANT AND ENZYME INHIBITORY EFFECTS OF
NASTURTIIUM OFFICINALE

Murat ZOR¹ , Sultan PEKACAR^{2*} , Didem DELİORMAN ORHAN² 

¹Lokman Hekim Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Ana Bilim Dalı, 06510, Ankara,
Türkiye

²Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Ana Bilim Dalı, 06510, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Antidiyabetik potansiyeli olan, kilo kontrolünü sağlamaya yönelik ve antioksidan etkili yeni doğal kaynakların keşfi fitoterapi uygulamalarında önemli hedeflerden biridir. Bu çalışmada, *Nasturtium officinale* bitkisinin toprak üstü kısımlarının %80’lik etanol ekstresinin antioksidan, antidiyabetik, antihiperlipidemik ve antiobezite aktiviteleri değerlendirilmiştir. Ekstrenin fenolik içeriği ile ilgili kalitatif ve kantitatif analizler spektroskopik ve kromatografik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Gereç ve Yöntem: Ekstrenin antioksidan etkisini belirlemek için DPPH ve ABTS radikal süpürme aktivitesi, metal bağlama, total antioksidan kapasitesi ve indirgeyici gücü incelenmiştir. Ekstrenin antidiyabetik etki potansiyelini değerlendirmek için; α -glukozidaz ve α -amilaz enzimleri, antiobezite etki potansiyeli için pankreatik lipaz enzimi ve lipid metabolizmasındaki etki potansiyeli için pankreatik kolesterol esteraz enzimi kullanılmıştır. Ekstrenin total fenol ve flavonoid içerik analizleri için UV spektroskopisi kullanılırken fenolik bileşiklerinin kalitatif ve kantitatif analizleri için ise Ters Faz-YPSK tekniğinden faydalanılmıştır.

Sonuç ve Tartışma: *Nasturtium officinale* etanol ekstresi DPPH radikal süpürücü aktivite yönteminde 2 mg/ml konsantrasyonunda 81.80 ± 1.14 oranında inhibisyona neden olurken, ekstrenin demir indirgeme gücü 0.896 ± 0.02 olarak belirlenmiştir. Antidiyabetik etki açısından, ekstre en yüksek etkinliği 2 mg/ml konsantrasyonda α -amilaz enzimini 39.11 ± 2.98 oranında inhibe ederek göstermiştir. Ekstrenin (42.18 ± 5.22) pankreatik lipaz enzimi üzerinde orlistat’a (65.13 ± 1.24) yakın oranda bir inhibisyon oluşturduğu tespit edilmiştir. Ters Faz-YPSK analizi sonucunda klorojenik asit, kafeik asit ve elajik asidin hem kalitatif hem kantitatif analizi yapılmıştır. Ekstrenin en fazla klorojenik asit ($0.079 \pm 0.000\%$ g/100 g ekstre) içerdiği tespit edilmiştir. Bulgular, bitkinin obezite kontrolü için doğal ürün geliştirme çalışmalarına kaynak teşkil edebileceğini ve daha ileriki in vitro ve in vivo çalışmalarla bu etkinin değerlendirilebileceğine işaret ederken, ekstrenin standardizasyonunda klorojenik asitin kullanılabilirliği öngörülmüştür.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Sultan Pekacar
e-posta / e-mail: sultanpkci94@gmail.com, Tel./ Phone: +903122023172

Anahtar Kelimeler: Antidiyabetik, antiobezite, antioksidan, *Nasturtium officinale*, ters faz-YPSK

ABSTRACT

Objective: The discovery of new natural resources with antidiabetic potential, weight control and antioxidant effect is one of the important targets in phytotherapy applications. In this study, the antioxidant, antidiabetic, antihyperlipidemic, and antiobesity activities of 80% ethanol extract of the aerial parts of *Nasturtium officinale* were evaluated. Qualitative and quantitative analyzes of the phenolic content of the extract were performed using spectroscopic and chromatographic methods

Material and Method: In order to determine the antioxidant effect of the extract, DPPH and ABTS radical scavenging activity, metal chelating, total antioxidant capacity and reducing power were investigated. To evaluate the antidiabetic effect potential of the extract; α -glucosidase and α -amylase enzymes, pancreatic lipase enzyme for its antiobesity effect potential and pancreatic cholesterol esterase enzyme for its effect potential on lipid metabolism were used. While UV spectroscopy was used for total phenol and flavonoid content analysis of the extract, Reverse Phase-HPLC technique was used for qualitative and quantitative analysis of phenolic compounds.

Result and Discussion: While *Nasturtium officinale* ethanol extract caused $81.80 \pm 1.14\%$ inhibition at 2 mg/ml concentration in DPPH radical scavenging activity method, the ferric reducing power of the extract was determined as 0.896 ± 0.020 . In terms of antidiabetic effect, the extract showed the highest efficiency by inhibiting the α -amylase enzyme at a concentration of 2 mg/ml by $39.11\% \pm 2.98\%$. It was determined that the extract ($42.18 \pm 5.22\%$) had an inhibition on pancreatic lipase enzyme close to orlistat ($65.13 \pm 1.24\%$). As a result of Reverse Phase-HPLC analysis, both qualitative and quantitative analyzes of chlorogenic acid, caffeic acid and ellagic acid were performed. It was determined that the extract contains the most chlorogenic acid ($0.079 \pm 0.000\%$ g/100g extract). While the findings indicate that the plant can be a source of natural product development studies for obesity control and that this effect can be evaluated with further in vitro and in vivo studies, it is predicted that chlorogenic acid can be used in the standardization of the extract.

Keywords: Antidiabetic, antiobesity, antioxidant, *Nasturtium officinale*, reverse phase-HPLC

GİRİŞ

Nasturtium officinale R. Br., Brassicaceae familyasına ait olan sucul ve çok yıllık bir bitkidir [1]. Avrupa ve Asya'ya özgü olan bu bitki, bulunduğu bölgelerde ekonomik olarak değerli kabul edilmekte ve ülkemizde "su teresi" ismi ile bilinmektedir. Su teresi, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi tarafından güvenli, yenilebilir bir bitki olarak değerlendirilip "yeşil yapraklı sebzeler, otlar ve yenilebilir çiçekler" monograflarına dahil edilmiştir [2]. Mineral ve vitamin açısından zengin olan bu bitki yeterli miktarda lif içermesinin yanında kalori içeriğinin düşük olmasıyla bilinmektedir [1]. Bitki yüksek miktarda glukosinolat içermekle birlikte alkaloid, flavonoid, saponin, terpenoid, protein, uçucu yağ, glikozitler, tanen, karotenoid, polifenol, C vitamini, A vitamini ve α -tokoferol gibi çeşitli primer ve sekonder metabolitleri de ihtiva etmektedir [3,4]. *N. officinale*'nin sağlığa olan faydaları ve zengin besin içeriği nedeniyle, antik çağlardan beri hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [1]. Bitkinin yaprakları geleneksel olarak midevi, idrar ve balgam söktürücü, hipoglisemik, ve uyarıcı olarak kullanılır. Ayrıca astım, bronşit, iskorbüt, tüberküloz ve idrar yolu enfeksiyonu ve taşlarını tedavi etmek için de tercih edilen bir bitkidir. Bitkinin antimikrobiyal, antioksidan, antiöstrojenik, antikanserojenik aktivitelere sahip olduğu literatürde bildirilmiştir. *N. officinale* geleneksel İran halk tıbbında antidiyabetik olarak

kullanılmaktadır [3]. İran'ın güneydoğu bölgesi halkı tarafından halk hekimliğinde kullanılan *N. officinale*'nin hipolipidemik aktiviteye sahip olması, antioksidan potansiyeli ile ilişkilendirilmiştir [5].

Amerikan Diyabet Derneği diabetes mellitus'u, insülin sekresyonu ve/veya insülin işlev problemlerinin neden olduğu hiperglisemi ile karakterize edilen metabolik bir hastalık olarak sınıflandırmıştır. Dünya nüfusunun yaklaşık %2.8'inin diabetes mellitus hastası olduğu ve 2025 yılına kadar nüfusun %5.4'ünün etkileneceği tahmin edilmektedir. Mitokondride, hiperglisemiye yanıt olarak dinamik morfolojik değişikliklere uğrayan reaktif oksijen türlerinin (ROS) artan üretimi, diyabetik komplikasyonların ve obezitenin ana nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Oksidatif stress, diyabet etiolojisinde önemli bir rol oynar, mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlara, katarakta, nefropatiye ve nörolojik bozukluklara neden olabilmektedir. Ayrıca diyabetli hastaların antioksidan savunma sistemi zayıflamış olup, serbest radikaller tarafından doku hasarı riski artmaktadır [6]. Hipergliseminin yanı sıra, diabetes mellitus hastalığında plazma lipid seviyeleri genellikle yükselmekte olup koroner kalp hastalığı için bir risk faktörü oluşturmaktadır. Diyet veya ilaç tedavisi yoluyla serum lipid düzeylerinin düşürülmesi, vasküler hastalık riskinde ve ilgili komplikasyonlarda azalma ile ilişkili olmaktadır. Son zamanlarda, serum kolesterol ve trigliserit düzeylerini azaltabilen veya düzenleyebilen bitkisel ilaçlara olan ilgi artmaktadır [3].

Bu çalışmada, *N. officinale* bitkisinin toprak üstü kısmından hareketle %80 etanol ile hazırlanan ekstresinin antidiyabetik (α -amilaz ve α -glukozidaz inhibitörü) ve antiobezite (pankreatik lipaz inhibitörü) aktiviteleri ve pankreatik kolesterol esteraz enzimi üzerindeki inhibisyonu değerlendirilmiştir. Ayrıca, *N. officinale* etanol ekstresinin antioksidan potansiyelleri total antioksidan kapasite, metal bağlama, indirgeme gücü, 2,2-difenil-1- pikrilhidrazil (DPPH) ve 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) katyon (ABTS⁺) radikal süpürücü aktivite deneyleri ile belirlenmiştir. Ekstrelerin toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlenirken, total flavonoit miktar tayini ise alüminyum klorür yöntemi ile yapılmıştır. Standardizasyon için Ters Faz-YPSK yöntemi kullanılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bitki Materyali

N. officinale bitkisinin toprak üstü kısımları Sakarya ili, Geyve ilçesi, Karaçay deresi etrafından Mayıs 2020'de toplanmıştır. Bitkinin botanik teşhisi Dr. Öğretim Üyesi Murat ZOR tarafından yapılmıştır (¹Lokman Hekim Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Ana Bilim Dalı, Ankara). Bitkinin herbaryum örnekleri Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda saklanmaktadır (HUEF21024).

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Ekstraksiyonda ve YPSK analizlerinde, enzim inhibisyonu ve aktivite değerlendirme çalışmalarında kullanılan solvanlar ve kimyasal maddeler yüksek saflıkta olup Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

Ekstraksiyon

N. officinale bitkisinin kurutulmuş toprak üstü kısımları (10.18 g) 200 ml %80'lik etanol ile oda ısısında çalkalayıcıda 14-18 saat ekstraksiyona bırakılmıştır. Bekleme işleminin ardından ekstre süzölmüş ve örnek üzerine solvan ilave edilerek aynı işlemler 3 kez tekrarlanmıştır. Daha sonra toplanan süzöntüler rovataporda alçak basınç altında 40°C'de kuruluğa kadar yoğunlaştırılmış ve verim hesabı yapılmıştır (%30.18 a/a).

Bitki Ekstresinin Kimyasal Bileşimi

Total Fenol İçeriği

%80'lik etanol ekstresi üzerine Folin-Ciocalteu reaktifi (%10 a/h) ilave edildikten sonra ekstre 25°C'de 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra %7.5'lük (a/h) sodyum karbonat çözeltisi ilave edilmiştir. Ekstreler karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyon işleminden sonra ELISA (SpectraMax i3x, Molecular Devices, ABD) mikropalak okuyucu ile 735 nm dalga boyunda ekstrenin absorbansı ölçölmüştür. Total fenol içerik gallik asit eşdeğeri (GAE) mg/g ekstre olarak hesaplanmıştır. Kalibrasyon denklemi $y = 6.3667x - 0.0118$ olarak bulunmuştur ve $r^2 = 0.9999$ olarak hesaplanmıştır [7].

Total Flavonoid İçeriği

%80'lik etanol ekstresi üzerine etanol, sodyum asetat ve alüminyum klorür çözeltileri eklenmiş ve karışım distile su ile 1 ml'ye seyreltilmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakikalık inkübasyondan sonra, karışımın absorbansı, ELISA mikropalak okuyucusu ile 415 nm'de ölçölmüştür. Sonuçlar kersetin eşdeğeri (KE) mg/g ekstre olarak ifade edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi denklemi; $y = 2.1694x - 0.0067$ olarak bulunmuştur ve $r^2 = 1$ olarak hesaplanmıştır [8].

Antioksidan Aktivite

Total Antioksidan Kapasite Deneyi

Ekstreler distile su ve molibdat reaktifi eklenerek, tüpler vortekslenmiştir. 90°C'de 90 dakika inkübasyondan sonra tüpler buz banyosunda soğutulmuştur. Örneklerin absorbansları 695 nm'de bir ELISA mikropalak okuyucu ile ölçölmüştür ve sonuçlar askorbik asit eşdeğeri (AAE) mg/g ekstre olarak ifade edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi denklemi $y = 1.8309x - 0.1606$ olarak bulunmuştur ve $r^2 = 0.9981$ olarak hesaplanmıştır [9].

DPPH Radikal Süpürücü Etki

Ekstrelerin DPPH radikal süpürme aktivitesi, 96 kuyucuklu mikropklarda incelenmiştir. 1 mM DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) çözeltisi, ekstreler üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra 30 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Bu işlemde sonra ekstrelerin ve referans bileşiğın absoransı, ELISA mikropklak okuyucu ile 520 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Referans bileşik olarak askorbik asit kullanılmıştır. DPPH radikal süpürme aktivitesi (% inhibisyon) = $[(\text{Absorbans}_{\text{kontrol}} - \text{Absorbans}_{\text{örnek}}) / \text{Absorbans}_{\text{kontrol}}] \times 100$ şeklinde hesaplanmıştır. Deneyle 3 tekrar şeklinde yapılmıştır [10].

Metal Bağlama Kapasitesi

Metal bağlama kapasitesi değeriendirilecek ekstrele 2 mM FeCl₂ çözeltisi eklenip oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 5 mM ferrozın çözeltisi ilave edilerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra eksterelerin ve referans bileşiğın absoransı değeri ELISA mikropklak okuyucusu ile 562 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Referans bileşik olarak EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik asit) kullanılmıştır. Ferrozın-Fe⁺² kompleksi oluşumunun inhibisyon yüzdesi şu formül kullanılarak hesaplanmıştır. % Metal bağlama kapasitesi = $[(\text{Absorbans}_{\text{kontrol}} - \text{Absorbans}_{\text{örnek}}) / \text{Absorbans}_{\text{kontrol}}] \times 100$. Deneyle 3 tekrar şeklinde yapılmıştır [11].

İndirgeme Gücü

Ekstrelerin ve referans maddenin üzerine pH=7.2 olan 0.1 mol/L sodyum fosfat tamponu eklenmiştir. Daha sonra %1'lik (a/h) K₃Fe(CN)₆ çözeltisi eklenerek 37°C'de etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından %10 trikoloroasetik asit çözeltisi de eklenerek ELISA mikropklak okuyucusu ile 700 nm dalga boyunda absoransı değeri hesaplanmıştır. Ölçümden sonra %0.1 (a/h) FeCl₃ çözeltisi ilave edilip tekrar absoransı ölçümü yapılip iki absoransı ölçümü arasındaki fark hesaplanmıştır. Kersetin ise referans madde olarak kullanılmıştır. Deneyle 3 tekrar şeklinde yapılmıştır [9].

ABTS Radikal Süpürücü Aktivite

ABTS (7 mM), distile su ve 2.45 mM potasyum persülfat çözeltisi içinde çözülmüştür. Karışım karanlıkta 20°C'de 16 saat inkübe edilmiştir. Ekstrele pH ayarlı ABTS ve fosfat tampon çözeltileri ilave edilmiştir. Örnekler vortekslendikten sonra absoransları 734 nm'de ELISA mikropklak okuyucusunda okunmuştur. Referans bileşik olarak gallik asit kullanılmıştır. ABTS radikal süpürme aktivitesi (% inhibisyon) = $[(\text{Absorbans}_{\text{kontrol}} - \text{Absorbans}_{\text{örnek}}) / \text{Absorbans}_{\text{kontrol}}] \times 100$ şeklinde hesaplanmıştır [9].

Enzim Yöntemleri

α -Glukozidaz Enzim İnhibisyon Aktivitesi Yöntemi

α -Glukozidaz tip IV enzimi fosfat tampon çözeltisi (0.5 M, pH 6.5) içinde çözüldü. Ekstreler %80'lik etanol çözeltisi ile farklı konsantrasyonlarda (2, 1, 0.5 ve 0.25 mg/ml) hazırlanmıştır. Enzim çözeltisi ve ekstreler, 37°C'de 15 dakika süreyle 96 kuyucuklu bir mikrolakta ön inkübasyona tabii tutulmuştur. Daha sonra kuyucuklara 20 mM *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranozit çözeltisi (PNG) ilave edilmiştir. Mikrolakta, 37 °C'de 35 dakika süreyle inkübe edildikten sonra, PNG'nin α -glukozidaz tarafından hidrolizi nedeniyle 405 nm'de absorpsiyondaki artış, bir ELISA mikrolak okuyucusunda ölçülmüştür. Akarboz (Bayer, Türkiye) referans olarak kullanılmıştır. Deneyler 3 tekrar şeklinde yapılmıştır [9].

α -Amilaz Enzim İnhibisyon Aktivitesi Yöntemi

α -Amilaz tip I-A (EC 3.2.1.1, Sigma) tampon çözeltisi içinde çözülmüştür. Fosfat tampon çözeltisi (pH 6.9) içinde hazırlanmış patates nişastası (%2.5, a/h) substrat çözeltisi olarak kullanılmıştır. Ekstreler, %80'lik etanol çözeltisi ile farklı konsantrasyonlarda (2, 1, 0.5 ve 0.25 mg/ml) hazırlanmıştır. Enzim çözeltisi ilave edildikten sonra karışımlar oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir ve içerisine substrat çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra karışımlar 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Karışımlara 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) renk reaktif çözeltisi (96 mM DNS, 2 M NaOH içinde 5.31 M sodyum potasyum tartarat) ilave edilerek, mikrolak içindeki karışım 80°C'lik etüve konulmuştur. 40 dakika sonra karışıma distile su ilave edilmiştir. Karışımların absorbansları 540 nm'de ELISA mikrolak okuyucusunda okunmuştur. Akarboz referans olarak kullanılmıştır. Standart maltoz kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. Üretilen maltoz miktarı, standart maltoz kalibrasyon grafiği ($y = 0.7618x - 0.1243$ ve $r^2 = 0.9949$) ve elde edilen net absorbans kullanılarak hesaplanmıştır. Deneyler 3 tekrar şeklinde yapılmıştır [9].

Pankreatik Lipaz Enzim İnhibisyon Aktivitesi Yöntemi

Pankreatik lipaz enzimi tip II çözeltisi, 10 mM 4-morfolinpropansülfonik asit ve 1 mM EDTA tampon çözeltisi (pH 6.8) içinde hazırlanmıştır. Ekstreler %80 etanol çözeltisi ile farklı konsantrasyonlarda (2, 1, 0.5 ve 0.25 mg/ml) hazırlanmıştır. Enzim çözeltisi ve ekstreler 96 kuyucuklu bir mikrolakta Tris tamponu (100 mM Tris-HCl ve 5 mM CaCl₂, pH 7.0) içinde 37°C'de 15 dakika ön inkübasyona maruz bırakılmıştır. Ardından kuyucuklara 4-nitrofenil butirat eklenmiştir. Mikrolakta, 37°C'de 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. 4-nitrofenilbutiratın pankreatik lipaz ile hidrolizi sonucunda 405 nm'de absorpsiyondaki artış, bir ELISA mikrolak okuyucusu ile ölçülmüştür. Orlistat referans olarak kullanılmıştır. Deneyler 3 tekrar şeklinde yapılmıştır [12].

Pankreatik Kolesterol Esteraz Enzim İnhibisyon Aktivitesi Yöntemi

Domuz pankreatik kolesterol enzimi, 100 mM NaCl içeren 100 mM tampon çözeltisi içinde çözülmüştür (pH 7). 50 µL fosfat tamponuna, dört farklı konsantrasyonda hazırlanan ekstreler ilave edilmiştir. Ardından taurokolik asit (12 mM) ve 5 mM *p*-NPB substratının da ilave edilmesinden sonra bu karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından domuz pankreatik kolesterol esteraz enzimi (0.1 µg/ml) karışıma ilave edilerek ELISA mikropalak okuyucu ile 405 nm’de 15 dakika kinetik okuma yapılmıştır. Referans madde olarak simvastatin kullanılmıştır [13].

Ters Faz-YPSK Yöntemi Kullanılarak Ekstrelerin Standardizasyonu

Analiz için kullanılan YPSK sisteminde, HP Agilent 1260 serisi LC Sistemi ve ACE 5 C18 (5 µm, 150 mm x 4.6 mm) kolonu kullanılmıştır. Cihazda ayrıca HP Agilent 1260 series Autosampler ünitesi bulunmaktadır. Analiz boyunca kolon sıcaklığı 25°C’ de sabitlenmiştir. Ekstredeki fenolik maddelerin ve flavonoidlerin kalitatif ve kantitatif analizleri için aşağıdaki standart madde karışımları kullanılmıştır. Fenolik madde karışımı: Gallik asit, protokateşik asit, klorojenik asit, vanilik asit, siringik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit, elajik asit, kafeik asit, *trans*-sinnamik asit, rosmarinik asit, epikateşin, kateşin. Flavonoid karışımı: Umbelliferon, rutin, naringenin, hesperidin, kersetin-3-*O*-glukozit, apigenin-7-*O*-glukozit, mirsetin, kersetin, luteolin, apigenin. Standart maddeler, Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Gradyent akış sistemi, %5 solvan A (asetonitril: su: formik asit, 50:50:0.5) ve %95 solvan B (su: formik asit, 100:0.5) içeren mobil faz ile başlatılmıştır. Toplam analiz süresi 55 dakika olup ve enjeksiyon hacmi 20 µl’dir. Analizler DAD detektörü kullanılarak 260, 280, 320 ve 350 nm olmak üzere 4 farklı dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Ekstrelerin konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde %25’lik asetonitril çözeltisinde hazırlanmıştır. Numune çözeltileri 0.45 µm membran filtreden süzölmüştür. Klorojenik asit, kafeik asit ve elajik asit için kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. Bu üç standart maddenin stok çözeltisinden hareketle 1, 5, 10, 20 ve 50 ppm konsantrasyonlarda dilüsyonları %25 asetonitril-su çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. Ppm değerlerine karşı (x), pik alanlarından (y) hareketle kalibrasyon eğrisi oluşturularak ekstre içerisindeki bu bileşiklerin miktar tayinleri yapılmıştır [14].

İstatistiksel Analiz

Tüm analizler üç tekrar olarak yapıлып sonuçların ortalaması alınmıştır. Tüm değerler ortalama ± standart sapma (S.S.) olarak ifade edilmiştir. Doğrusal regresyon analizleri ve hesaplamalar Microsoft Excel ve GraphPad InStat yazılımı kullanılarak yapılmıştır. $p < 0.05$ değerlerindeki bir fark istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

SONUÇ VE TARTIŞMA

N. officinale bitkisinin toprak üstü kısmından hareketle %80'lik etanol ile hazırlanan ekstrenin verimi %30.18 (a/a) olarak bulunmuştur. Ekstrenin total fenol içeriği 23.90 ± 1.20 GAE mg/g ekstre, total flavonoit içeriği ise 33.82 ± 1.41 KE mg/g ekstre olarak tespit edilmiştir.

N. officinale'nin toprak üstü kısımlarından %80'lik etanol ile hazırlanan ekstrenin antioksidan aktivitesini değerlendirmek için beş farklı yöntem kullanılmıştır. Bitkinin etanol ekstresinin total antioksidan kapasitesi (125.22 ± 7.42 AAE mg/g ekstre) olarak hesaplanmıştır. ABTS radikal süpürücü aktivite yönteminde doza bağlı olarak inhibisyonda bir artış görülse de bu değerler referans madde olan gallik asit ile kıyaslandığında oldukça düşük kalmıştır. Ekstrenin DPPH radikal süpürücü aktivite yönteminde 2 mg/ml konsantrasyonda 81.80 ± 1.14 'lik bir inhibisyon değeri bulunmuş olup bu değer referans madde olan askorbik asidin aynı konsantrasyonuyla mukayese edildiğinde 90.50 ± 0.59 'lik inhibisyon oranıyla askorbik asite yakın bir inhibisyon olarak değerlendirilmiştir. Metal bağlama kapasitesi deneyinde referans madde olan EDTA'nın denenen tüm konsantrasyonlarda %100 oranında bir inhibisyona neden olduğu görülürken ekstrenin test edilen en yüksek konsantrasyon olan 2 mg/ml'de 37.78 ± 5.07 'lik bir inhibisyon değeri gösterdiği bulunmuştur. İndirgeme gücü deneyinde bulunan absorbans değerleri doz bağımlı olarak artış göstermiştir. Bu deneyde ekstrenin ve referans madde olan kersetinin en yüksek konsantrasyonda bulunan absorbans değerleri sırasıyla 0.896 ± 0.02 ve 3.840 ± 0.14 olarak tespit edilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. *N. officinale* ekstresinin ABTS, DPPH radikal süpürücü aktivite, metal bağlama kapasitesi ve indirgeme gücü sonuçları

Ekstre ve referanslar		Antioksidan Aktivite Sonuçları			
Numune Adı	Konsantrasyon (mg/ml)	ABTS Radikal Süpürücü Etki % inhibisyon \pm SS.	DPPH Radikal Süpürücü Aktivite % inhibisyon \pm SS.	Metal Bağlama Kapasitesi % inhibisyon \pm SS.	İndirgeme Gücü Absorbans \pm SS.
<i>N. officinale</i> toprak üstü etanol ekstresi	0.25	$13.75 \pm 3.14^{**}$	$27.66 \pm 8.10^{***}$	2.67 ± 6.71^{ns}	$0.137 \pm 0.000^{***}$
	0.5	$15.40 \pm 2.25^{***}$	$47.71 \pm 1.07^{***}$	-	$0.259 \pm 0.010^{***}$
	1	$18.24 \pm 3.49^{***}$	$77.43 \pm 1.33^{***}$	6.12 ± 2.07^{ns}	$0.490 \pm 0.020^{***}$
	2	$27.13 \pm 0.81^{***}$	$81.80 \pm 1.14^{***}$	$37.78 \pm 5.07^{***}$	$0.896 \pm 0.020^{***}$
GA/AA/EDTA/KE	0.25	100^{a***}	$88.36 \pm 0.67^{b***}$	100^{c***}	$3.744 \pm 0.160^{d***}$
	0.5	$99.54 \pm 1.04^{a***}$	$89.38 \pm 0.61^{b***}$	100^{c***}	$3.931 \pm 0.000^{d***}$
	1	$98.94 \pm 0.26^{a***}$	$89.66 \pm 0.35^{b***}$	100^{c***}	$3.930 \pm 0.000^{d***}$
	2	$98.10 \pm 0.80^{a***}$	$90.50 \pm 0.59^{b***}$	100^{c***}	$3.840 \pm 0.140^{d***}$

-: Aktivite yok, SS: Standart Sapma, ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$
GA: Gallik asit, AA: Askorbik asit, EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit, KE: Kersetin

N. officinale toprak üstü etanol ekstresinin çeşitli enzimler üzerindeki inhibitör etkilerini değerlendirmek için *in vitro* olarak dört farklı yöntem seçilmiştir (α -glukozidaz, α -amilaz, pankreatik lipaz ve pankreatik kolesterol esteraz enzimleri). Antidiyabetik etki potansiyelini değerlendirmek amacıyla kullanılan α -glukozidaz ve α -amilaz enzimleri üzerindeki inhibitör etkiler mukayese edildiğinde, her iki enzim üzerinde de doz bağımlı olarak artan bir inhibisyon görülmüş olup, bu

inhibisyon değerlerinin aktivitenin gözlendiği tüm dozlarda α -amilaz enzimi için daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Her iki enzimin referans maddesi olan akkarboz ile ekstrenin inhibisyon değerleri karşılaştırıldığında ise bütün konsantrasyonlarda ekstrenin inhibisyon değerleri akkarbozdan düşük bulunmuştur. Ekstre 2 mg/ml konsantrasyonda pankreatik kolesterol esteraz enzimi üzerinde % 9.68 ± 2.16 'lık bir inhibisyon sağlarken aynı konsantrasyonda referans madde olan simvastatinin % inhibisyon değeri ise 53.18 ± 3.36 olarak bulunmuştur. Ekstre tüm enzim sistemleri içerisinde en yüksek inhibisyonu 2 mg/ml konsantrasyonda pankreatik lipaz enzimine karşı (% 42.18 ± 5.22) göstermiş olup aynı konsantrasyonda referans madde olan orlistatin inhibisyon değeri ise % 65.13 ± 1.24 olarak bulunmuştur (Tablo 2).

Tablo 2. *N. officinale* etanol ekstresinin α -glukozidaz, α -amilaz, pankreatik lipaz ve pankreatik kolesterol esteraz enzimi üzerindeki inhibitör aktivite sonuçları

Ekstre ve referanslar		% inhibisyon \pm SS.			
Numune Adı	Konsantrasyon (mg/ml)	α -Glukozidaz	α -Amilaz	Pankreatik lipaz	Pankreatik kolesterol esteraz
<i>N. officinale</i> toprak üstü etanol ekstresi	0.25	-	-	-	1.40 ± 1.91 ^{ns}
	0.5	5.80 ± 3.00 ^{ns}	7.59 ± 5.67 ^{ns}	1.15 ± 5.77 ^{ns}	4.60 ± 3.91 ^{ns}
	1	6.26 ± 6.86 ^{ns}	23.88 ± 0.17 ^{ns}	4.49 ± 0.22 ^{ns}	6.91 ± 2.58 ^{ns}
	2	29.85 ± 0.80 ^{***}	39.11 ± 2.98 ^{**}	42.18 ± 5.22 ^{***}	9.68 ± 2.16 ^{**}
AKA/OR/SIM	0.25	99.33 ± 0.02 ^{a***}	76.44 ± 1.98 ^{a***}	56.41 ± 5.25 ^{b***}	40.67 ± 4.12 ^{c***}
	0.5	99.45 ± 0.00 ^{a***}	82.16 ± 1.29 ^{a***}	62.44 ± 9.74 ^{b***}	47.88 ± 5.11 ^{c***}
	1	99.79 ± 0.23 ^{a***}	88.17 ± 5.67 ^{a***}	64.23 ± 2.72 ^{b***}	52.21 ± 0.12 ^{c***}
	2	100.20 ± 0.07 ^{a***}	92.99 ± 3.08 ^{a***}	65.13 ± 1.24 ^{b***}	53.18 ± 3.36 ^{c***}

-: Aktivite yok, SS: Standart Sapma, ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$
^aAKA: Akkarboz, ^bOR: Orlistat, ^cSIM: Simvastatin

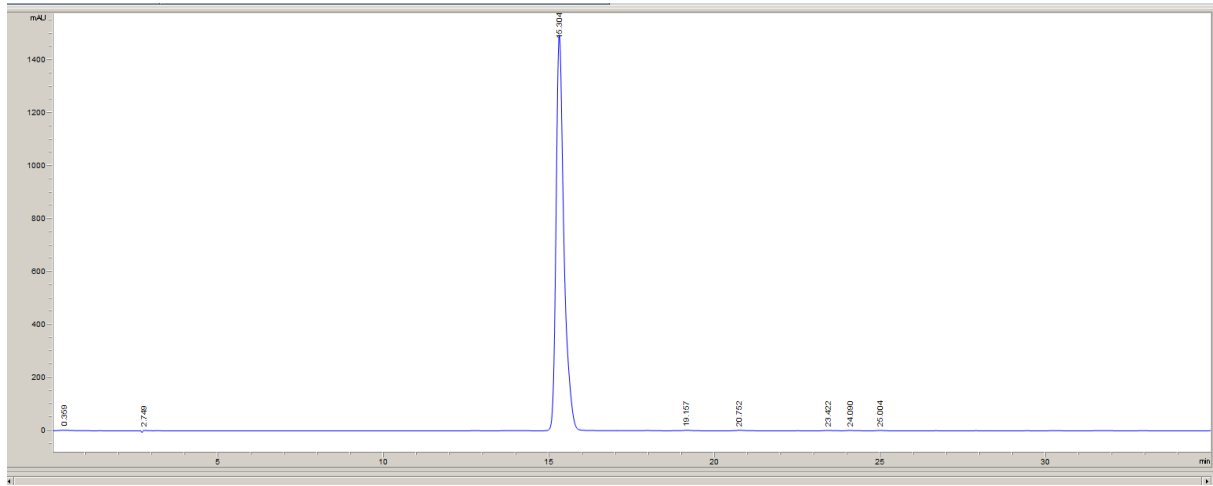
N. officinale toprak üstü kısmından hazırlanan etanolü ekstrenin fitokimyasal içeriğini aydınlatmak amacıyla Ters Faz-YPSK kullanılarak çeşitli fenolik bileşik ve flavonoidler kalitatif ve kantitatif analizler için incelenmiştir. Ekstrenin Ters Faz-YPSK ile klorojenik asit, kafeik asit ve elajik asit içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 1-5). Kromatogramlarda majör olarak görülen piklerin standart fenolik madde koleksiyonumuzda bulunmayan başka fenolik maddelere ait pikler olduğu düşünülmüştür. Analiz sonucunda en fazla miktarda bulunan bileşiğin klorojenik asit (0.079 ± 0.000 g/100 g ekstre), onu takip eden bileşiğin kafeik asit (0.012 ± 0.000 g/100 g ekstre) olduğu ve ekstrenin en az miktarda elajik asit (0.006 ± 0.000 g/100 g ekstre) içerdiği saptanmıştır (Tablo 3).

Tablo 3. *N. officinale* etanol ekstresinin Ters Faz-YPSK ile klorojenik asit, kafeik asit ve elajik asit miktarları (g/100g kuru ekstre) ve bileşiklerin retansiyon zamanları

Numune	Bileşikler	Rt (dakika)	g/100 g kuru ekstre	Kalibrasyon Denklemleri	Determinasyon Katsayısı
<i>N. officinale</i> etanol ekstresi	Klorojenik asit	15.4	0.079 ± 0.000	$y = 123.37x - 59.538$	$r^2 = 0.9995$
	Kafeik asit	17.94	0.012 ± 0.000	$y = 103.48x - 74.883$	$r^2 = 0.9981$
	Elajik asit	30.13	0.006 ± 0.000	$y = 163.47x + 12.183$	$r^2 = 0.9998$

Özen (2009), Artvin civarından toplanmış *N. officinale* bitkisinin sulu ve etanollü yaprak ekstralarının antioksidan aktivitelerini (DPPH ve süperoksit radikal süpücü etki, indirgeme gücü, ferrik tiyosiyanat yöntemi ile total antioksidan kapasite ve *in vivo* olarak sıçan karaciğer, beyin ve böbrek dokularında lipid peroksidasyon ölçümü) değerlendirmiştir. Etkiler referans olarak kullanılan α - tokoferol, Butil Hidroksi Toluen ve Butil Hidroksi Anisol sonuçları ile kıyaslanmıştır. Bulgular, ekstraların hüresel lipid peroksidasyonunu azaltarak, indirgeme gücünü, serbest radikal ve süperoksit anyon radikal süpürücü aktivitelerini artırarak antioksidan aktivite gösterdiklerine işaret etmiştir [15].

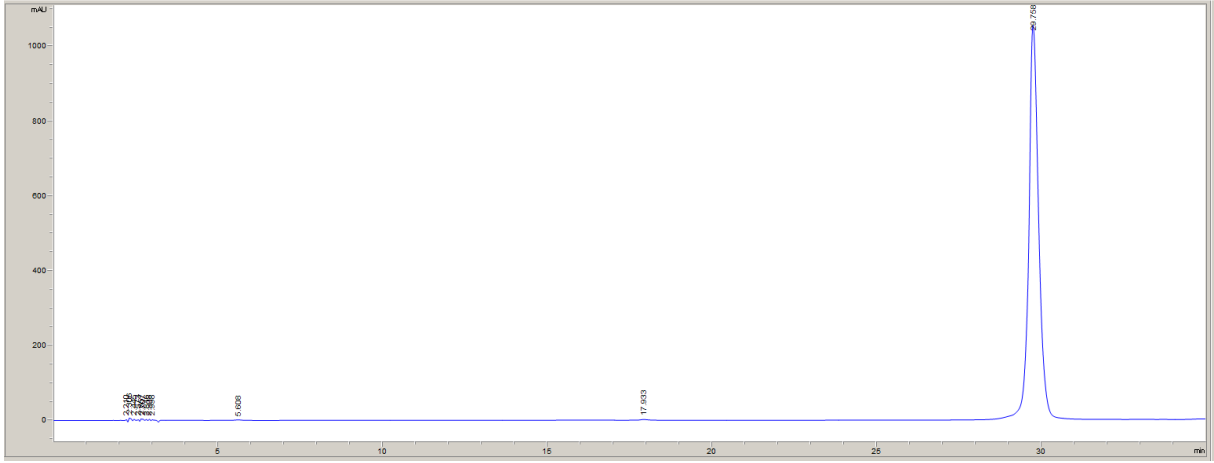
Bahramikia ve Yazdanparast (2010) İran'dan toplanmış bitkinin toprak üstü kısımlarının sulu etanollü ekstresinin (ABTS, DPPH, nitrik oksit radikal süpürücü, hidrojen peroksit süpürücü, indirgeme gücü, metal şelatlama aktiviteleri ve sıçan karaciğer homojenatında demir/askorbat nedenli lipid peroksidasyon üzerindeki etki) antioksidan etkisini değerlendirdikleri çalışmada, ekstrenin serbest radikalleri süpürerek, indirgeme gücünü azaltarak ve metal şelatlama mekanizması ile antioksidan etkiler gösterdiklerini öne sürmüşlerdir [16].



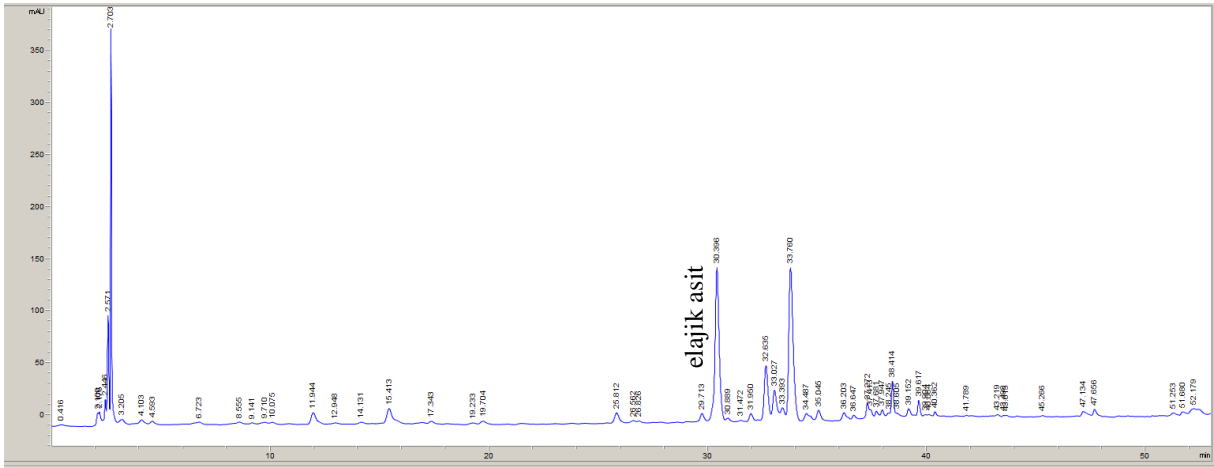
Şekil 1. Standart bileşik olan klorojenik asidin Ters faz-YPSK kromatogramı



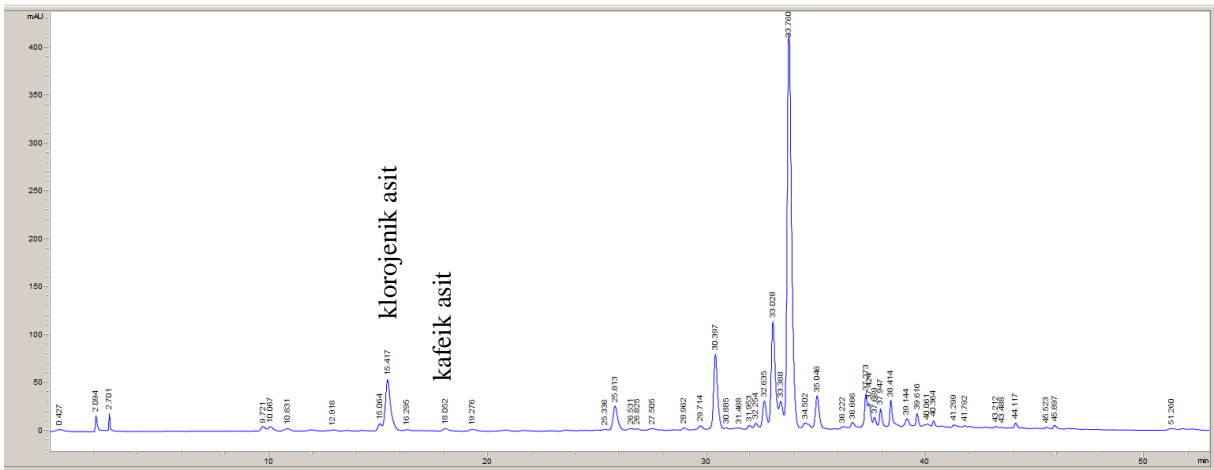
Şekil 2. Standart bileşik olan kafeik asidin Ters faz-YPSK kromatogramı



Şekil 3. Standart bileşik olan elajik asidin Ters faz-YPSK kromatogramı



Şekil 4. *N. officinale*'nin 260 nm'deki Ters faz-YPSK kromatogramı



Şekil 5. *N. officinale*'nin 320 nm'deki Ters faz-YPSK kromatogramı

Boligon ve arkadaşları (2013) tarafından Brezilya'da yetişen *N. officinale* bitkisinin dal ve yapraklarının %60'luk etanol ekstraktları ve fraksiyonlarının (diklorometan, etil asetat ve *n*-butanol) antioksidan aktiviteleri, total fenol ve flavonoit içerikleri, YPSK ile klorojenik asit, kafeik asit ve rutin

miktar tayinleri yapılmıştır. Tüm ekstre ve fraksiyonların total fenol içeriklerinin 104.40 ila 337.60 mg GAE/g ve total flavonoit içeriklerinin ise 71.83 ila 148.12 mg rutin/g arasında değiştiği tespit edilmiştir. DPPH radikal süpürücü aktivitede referans olarak kullanılan askorbik asitin IC₅₀ değeri 15.98 ± 1.30 µg/ml olarak bulunurken ham ekstrenin IC₅₀ değerinin 30.76 ± 0.19 µg/ml olduğu görülmüştür. En yüksek aktiviteye sahip olan *n*-butanol fraksiyonunun 8.99 ± 0.40 µg/ml'lik IC₅₀ değerinin bu fraksiyonun askorbik asitten bile daha güçlü DPHH radikal süpürücü aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. YPSK analizi sonuçlarına göre ham ekstrenin rutin (%1.92), kafeik asit (%5.08) ve klorojenik asit (%1.25) içerdiği tespit edilmiştir [17].

Alam Zeb (2015), Pakistan'dan toplanan *N. officinale* bitkisinin dal, sap ve kök kısımlarından hazırlanan metanollü ve sulu ekstrelerin fenolik profilini YPSK-DAD yöntemi ile antioksidan etkilerini DPPH radikal süpürücü aktivite yöntemi ile belirlemiştir. Kök, dal ve yaprak sulu ekstrelerinin total fenol içeriği sırasıyla 29.8, 70.4 ve 130.8 mg GAE/100 g olarak, metanol ekstrelerinin total fenol içeriği ise sırasıyla 205.99, 264.0 ve 321.1 mg GAE/100 g olarak hesaplanmıştır. YPSK-DAD yöntemi ile yapraklarda 14, köklerde 20 adet fenolik bileşik tespit edilirken, bu bileşiklerin miktar tayinleri yapılmamıştır. Her iki kısım için kumarik asit ve türevleri, kaftarik asit ve türevleri ve kersetinin major bileşikler olduğu tespit edilmiştir. DPPH radikal süpürücü aktivite sonuçları, bitkinin her üç kısmı için metanollü ekstrelerin (kök: %70.0, dal: %78.0 ve yaprak: %81.6) sulu ekstrelerine göre daha güçlü antioksidan etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ekstrelerin aktivitesi referans olarak kullanılan Butil Hidroksi Toluen'e yakın bulunmuştur [18].

Zafar ve arkadaşları (2017), Pakistan'dan toplamış oldukları örneklerden hazırlamış oldukları metanol ekstresinde total fenol miktarını 4.5 mg GAE/g olarak bulmuşlardır. YPSK analizi sonucunda morin ve klorojenik asitin varlığı tespit edilirken miktarları hakkında herhangi bir bilgi verilmemiştir [19].

Antidiyabetik etkinin değerlendirilmesi amacıyla streptozotosin-nedenli diyabetik sıçanlarda yapılan *in vivo* çalışmalarda, *N. officinale* bitkisinden hazırlanmış olan etilasetatlı ekstrenin 100 mg/kg dozda 2 ay boyunca hayvanlara uygulanması sonucunda ekstrenin glibenklamite yakın oranda kan şekeri seviyelerini düşürdüğü görülmüştür [20].

İran'dan toplanmış olan *N. officinale* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanmış olan sulu etanollü ekstre 100 ve 200 mg/kg dozlarda 4 hafta boyunca streptozotosin-nedenli diyabetik sıçanlara oral olarak uygulanmıştır. Ekstre 200 mg/kg dozda hipoglisemik ve hipolipidemik etkiler göstermiştir [21].

Fenton-Navarro ve arkadaşları (2018) bitkinin yapraklarının sulu, asetonlu ve alkollü ekstrelerinin antidiyabetik aktivitesini, alloksan ve streptozotosin-nedenli diyabetik sıçanlarda test etmiştir. Sulu ekstrenin 900 mg/kg dozda 8 hafta boyunca oral olarak uygulanması sonrasında hem

alloksan hem de hem streptozotosin-nedenli diyabetik sıçanlarda kan şekerinin insulin uygulanmış grup kadar düştüğü ve diyabet nedenli oksidatif stresi azalttığı tespit edilmiştir [22].

In vivo olarak yüksek yağ içerikli diyetle beslenen sıçanlarda yapılan antihiperlipidemik aktivite çalışmasında ise *N. officinale* etanollü ekstresinin serum LDL seviyelerinde anlamlı düşümlere neden olduğu tespit edilmiştir [23].

Bu çalışma, *N. officinale* bitkisinin α -glukozidaz, pankreatik lipaz ve kolesterol esteraz enzimleri üzerindeki etkisinin değerlendirildiği ilk çalışmadır. Tüm bu literatür bulgularını değerlendirdiğimizde; *N. officinale* bitkisinin total fenol ve flavonoid içeriklerinin farklılıklar gösterdiği; bu duruma toprak, iklim gibi faktörlerin yanısıra toplama zamanının da etki edebileceği düşünülmüştür. DPPH radikal süpürücü aktivite dışında ekstrenin herhangi bir güçlü antioksidan etki gösteremediği ve yine bu durumun diğer literatürlerle mukayese ettiğimizde düşük total ve flavonoid içeriklerinden kaynaklanabileceği öngörülmüştür. Çalışmada antidiyabetik etkisi *in vivo* çalışmalarla belirlenmiş olan *N. officinale* bitkisinin karbonhidrat sindiriminde rol oynayan α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiş, fakat ekstrenin bu enzimler üzerinde çok etkili olmadığı tespit edilmiştir. Yani daha önceki çalışmalarda ekstrenin *in vivo* olarak tespit edilen antidiyabetik etkisinin diğer farklı mekanizmalar üzerinden gösterdiği sonucuna varılmıştır. Literatür taramaları bitki ekstresinin *in vivo* çalışmalarla antihiperlipidemik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bu sebeple bu çalışmada, ekstrenin kolesterol esteraz enzimi üzerindeki etkisi *in vitro* olarak incelenmiş, fakat ekstrenin kolesterol sentezin inhibisyonu üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı sonucuna varılmıştır. Diğer yandan obezite kontrolünde etkili olan pankreatik lipaz enzimi üzerinde ekstrenin orlistata yakın bir etki göstermesi bu bitkinin obezite kontrolü için doğal ürün geliştirme çalışmalarına kaynak teşkil edebileceğini ve daha ileriki *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla bu etkinin değerlendirilebileceği görüşünü oluştururken; aktif ekstrenin standardizasyonunun klorojenik asit üzerinden yapılabileceği sonucuna varılmıştır.

YAZAR KATKILARI

Kavram: M.Z., S.P., D.D.O.; Tasarım: M.Z., S.P., D.D.O.; Denetim: M.Z., S.P., D.D.O.; Kaynaklar: M.Z., S.P., D.D.O.; Malzemeler: M.Z., S.P., D.D.O.; Veri Toplama ve/veya işleme: M.Z., S.P., D.D.O.; Analiz ve/veya yorumlama: M.Z., S.P., D.D.O.; Literatür taraması: M.Z., S.P., D.D.O.; Makalenin yazılması: M.Z., S.P., D.D.O.; Kritik inceleme: M.Z., S.P., D.D.O.; Diğer: M.Z., S.P., D.D.O.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

ETİK KURUL ONAYI

Yazarlar bu çalışma için etik kurul onayının zorunlu olmadığını beyan etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Haro, G., Iksen, I., Rumanti, R.M., Marbun, N., Sari, R.P., Gultom, R.P.J. (2018). Evaluation of antioxidant activity and minerals value from watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). *Rasayan Journal of Chemistry*, 11(1), 232-237. [\[CrossRef\]](#)
2. Doğan, M. (2020). Su teresinin (*Nasturtium officinale* R. BR.) beslenme-diyet potansiyeli ve antioksidan özellikleri: bir derleme. *International Anatolia Academic Online Journal Health Sciences*, 6(3), 222-233.
3. Hadjzadeh, M.A.R., Rajaei, Z., Moradi, R., Ghorbani, A. (2015). Effects of hydroalcoholic extract of watercress (*Nasturtium officinale*) leaves on serum glucose and lipid levels in diabetic rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 59(2), 223-230.
4. Al-Snafi, A.E. (2020). A review on *Nasturtium officinale*: A potential medicinal plant. *IOSR Journal of Pharmacy*, 10(9), 33-43.
5. Hoseini, H.F., Gohari, A.R., Saeidnia, S., Majd, N.S., Hadjiakhoondi, A. (2009). The effect of *Nasturtium officinale* on blood glucose level in diabetic rats. *PharmacologyOnline*, 3, 866-871.
6. Fenton-Navarro, B., Martínez, M.U., Castro, B.F., Castillo, O.M., López-Rodríguez, M., Arellanes, S.P., Hernández, A.V. (2018). Antioxidant and hypoglycemic effects of watercress (*Nasturtium officinale*) extracts in diabetic rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 15(2), 68-79. [\[CrossRef\]](#)
7. Zongo, C., Savadogo, A., Ouattara, L., Bassole, I.H.N., Ouattara, C.A.T., Ouattara, A.S., Barro, N., Koudou, J., Traore, A.S. (2010). Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of *Ampelocissus grantii* (Baker) Planch. (Vitaceae): a medicinal plant from Burkina Faso. *International Journal of Pharmacology*, 6(6), 880-887. [\[CrossRef\]](#)
8. Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S., Vladimir-Knezevic, S. (2004). Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharmaceutica*, 54(1), 65-72.
9. Orhan, N., Deliorman Orhan, D., Gökbulut, A., Aslan, M., Ergun, F. (2017). Comparative analysis of chemical profile, antioxidant, *in-vitro* and *in-vivo* antidiabetic activities of *Juniperus foetidissima* Willd. and *Juniperus sabina* L. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 16(Special Issue), 64-74.
10. Jung, H.A., Jin, S.E., Choi, R.J., Manh, H.T., Kim, Y.S., Min, B.S., Son, Y.K., Ahn, B.R., Kim, B.W., Sohn, H.S., Choi, J.S. (2011). Anti-tumorigenic activity of sophoflavescenol against lewis lung carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Archives of Pharmacal Research*, 34(12), 2087-2099. [\[CrossRef\]](#)
11. Dinis, T.C.P., Maderia, V.M.C., Almeida, L.M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation

- and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315(1), 161-169. [\[CrossRef\]](#)
12. Lee, Y.M., Kim, Y.S., Lee, Y., Kim, J., Sun, H., Kim, J.H., Kim, J.S. (2012). Inhibitory activities of pancreatic lipase and phosphodiesterase from Korean medicinal plant extracts. *Phytotherapy Research*, 26(5), 778-782. [\[CrossRef\]](#)
 13. Ngamukote, S., Mäkynen, K., Thilawech, T., Adisakwattana, S. (2011). Cholesterol-lowering activity of the major polyphenols in grape seed. *Molecules*, 16(6), 5054-5061. [\[CrossRef\]](#)
 14. Gök, H.N., Deliorman Orhan, D., Gürbüz, İ., Aslan, M. (2020). Activity-guided isolation of α -amylase, α -glucosidase, and pancreatic lipase inhibitory compounds from *Rhus coriaria* L. *Food Chemistry*, 85(10), 3220-3228. [\[CrossRef\]](#)
 15. Özen, T. (2009). Investigation of Antioxidant Properties of *Nasturtium officinale* (Watercress) Leaf Extracts. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*. 66(2), 187-193.
 16. Bahramikia, S., Yazdanparast, R. (2010). Antioxidant efficacy of *Nasturtium officinale* extracts using various *in vitro* assay systems. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*. 3(4), 283-290. [\[CrossRef\]](#)
 17. Boligon, A.A., Janovik, V., Boligon, A.A., Pivetta, C.R., Pereira, R.P., Rocha, J.B.T.D., Athayde, M.L. (2013). HPLC analysis of polyphenolic compounds and antioxidant activity in *Nasturtium officinale*. *International Journal of Food Properties*. 16(1), 61-69. [\[CrossRef\]](#)
 18. Zeb, A. (2015). Phenolic profile and antioxidant potential of wild watercress (*Nasturtium officinale* L.) *SpringerPlus*. 4(1), 1-7. [\[CrossRef\]](#)
 19. Zafar, R., Zahoor, M., Shah, A.B., Majid, F. (2017). Determination of antioxidants and antibacterial activities, total phenolic, polyphenol and pigment contents in *Nasturtium officinale*. *Pharmacology Online*, 1, 11-18.
 20. Hoseini, H.F., Gohari, A.R., Saeidnia, S., Majd, N.S., Hadjiakhoondi, A. (2009). The effect of *Nasturtium officinale* on blood glucose level in diabetic rats. *Pharmacology Online*, 3, 866-871.
 21. Hadjzadeh, M.A.R., Rajaei, Z., Moradi, R., Ghorbani, A. (2015). Effects of hydroalcoholic extract of watercress (*Nasturtium officinale*) leaves on serum glucose and lipid levels in diabetic rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 59(2), 223-230.
 22. Fenton-Navarro, B., Martínez, M.U., Castro, B.F., Castillo, O.M., López-Rodríguez, M., Arellanes, S.P., Hernández, A.V. (2018). Antioxidant and hypoglycemic effects of watercress (*Nasturtium officinale*) extracts in diabetic rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 15(2), 68-79.
 23. Bahramikia, S., Yazdanparast, R. (2008). Effect of hydroalcoholic extracts of *Nasturtium officinale* leaves on lipid profile in high-fat diet rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(1), 116-121.



ARE THE DISINFECTANTS USED IN HOSPITALS ALSO EFFECTIVE ON BACTERIA THAT CAUSE NOSOCOMIAL INFECTIONS?: A UNIVERSITY HOSPITAL INVESTIGATION

*HASTANEDE KULLANILAN DEZENFEKTANLAR NOZOKOMİYAL ENFEKSİYON
ETKENİ BAKTERİLER ÜZERİNE DE ETKİLİ Mİ?: BİR ÜNİVERSİTE HASTANESİ
GÖZLEMİ*

Çiğdem YAVAŞ¹ , Fatma KAYNAK-ONURDAĞ^{2*} , Suzan ÖKTEN² 

¹Trakya University, Health Center for Medical Research and Practice, 22030, Edirne, Turkey

²Trakya University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, 22030,
Edirne, Turkey

ABSTRACT

Objective: Determining the disinfectant activity regularly will result in proper disinfection. In our study, it was aimed to determine the efficacy, effective concentrations and durations of some disinfectants used in Trakya University Hospital against nosocomial bacteria isolated from the same center.

Material and Method: MRSA, VRE, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* isolates and 10 different disinfectants supplied from the same center were included in the study. Susceptibility tests and Qualitative Suspension Test were applied through the guidelines of CLSI M100-S25 and TS/EN/1040:2005 (formerly TS/EN/1040:1999), respectively. Qualitative Suspension Test was modified by using D/E Neutralizing Broth instead of adding a neutralizing agent.

Result and Discussion: As a result, it was determined that all isolates were susceptible in the application conditions. However, peracetic acid, sodium dichloroisocyanurate, non-ionic active agent and sodium hypochlorite containing disinfectants being used in the hospital were not effective against some strains isolated from the hospital. Even the resistance of a single isolate to the application conditions of a disinfectant may lead to selection and proliferation of the strains and this may cause hospital infections. Our results might provide a reference to indicate the importance of selecting appropriate disinfectants and appropriate conditions for cleaning and disinfection in hospitals.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, ESBL, *Klebsiella pneumoniae*, MRSA, Qualitative Suspension Test, VRE

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Fatma Kaynak Onurdağ
e-mail / e-posta: fatmakaynak@trakya.edu.tr, **Phone / Tel.:** +90 284 235 01 80 / 2192

ÖZ

Amaç: Dezenfektan aktivitesinin düzenli aralıklarla belirlenmesi, uygun dezenfeksiyonla sonuçlanacaktır. Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Hastanesinde kullanılan bazı dezenfektanların aynı merkezden izole edilen nozokomiyal bakterilere karşı etkinlik, etki konsantrasyonları ve sürelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: MRSA, VRE, *Klebsiella pneumoniae* ve *Acinetobacter baumannii* izolatları ile aynı merkezden temin edilen 10 farklı dezenfektan çalışmaya dahil edildi. Dirençli oldukları, CLSI önerileri doğrultusunda yapılan duyarlılık ve doğrulama testleri ile gösterilen izolatlar çalışmaya alınmış ve dezenfektan etkinliği TS/EN/1040:2005 (eski adıyla TS/EN/1040:1999) önerileri doğrultusunda kalitatif süspansiyon testi ile saptanmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Sonuç olarak perasetik asit, sodyumdikloroizosiyanurat, non-iyonik aktif madde ve sodyum hipoklorit hastaneden izole edilen bazı izolatlar üzerine etkisiz bulunmuştur. Uygulama koşullarında, bir dezenfektanın etki etmediği tek bir izolatın olması bile, bu süşun seçilimine ve çoğalmasına neden olarak hastane enfeksiyonlarına sebep olabilir. Bu nedenle, sonuçlarımızın, hastanelerde uygun dezenfektanların, uygun koşullarda uygulanması ve hastane görülen izolatlar üzerinde de test edilmesi gerektiğini göstermesi açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, ESBL, kalitatif süspansiyon testi, *Klebsiella pneumoniae*, MRSA, VRE

INTRODUCTION

Disinfection is the process of destroying microorganisms except the spores of spore-forming bacteria, on inanimate objects [1] and it may ensure the safe use of the instruments in a hospital when applied in the appropriate conditions [2]. The resistance of microorganisms to chemical and physical processes depends on their biochemical structures and their protection mechanisms. For this reason, although vegetative bacteria are generally susceptible to disinfectants, some may resist to certain agents [2-7]. Many Gram negative and Gram positive bacteria including *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp. survive on dry environmental surfaces for several months and cause hospital infections [8]. Contaminated surfaces in a hospital are the major causes in the transmission of nosocomial infections caused by antibiotic resistant bacteria. These infections vary from patient to patient or between two clinical presentations. In this case, the chemicals to be used must be effective on the resistant bacteria [9]. It is necessary that disinfectants can be reliably tested with microorganisms existing in the hospital environment and that the application method and application concentrations can be accurately determined [9]. Under the control of the hospital infection committees, disinfectants should be purchased by detecting effective disinfectants against existing microorganisms. Proper disinfectant detection may only be possible if the disinfectant activity is determined using appropriate and reliable methods on bacterial isolates from the hospital environment [9]. The type, number and localization of microorganisms; the type, density, contact duration of the disinfectant; many factors such as physical-chemical properties of the environment (heat, pH, organic-inorganic materials), presence of biofilm, properties of materials and surfaces affect the disinfection processes [10]. Since these properties affect the process and also, continuous use of a selected disinfectant may lead to the

development of resistant microorganisms, evaluation of resistance status should be made at certain intervals [2, 5-8, 11-15]. The basics of prevention and control of hospital infections are control methods such as hand hygiene, disinfection, sterilization, patient isolation, cleaning, in particular surveillance [13, 16].

In our study, it was aimed to determine the application concentrations and durations of the disinfectants used in Trakya University Hospital against bacteria isolated from the same center. Therefore, Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin Resistant *Enterococcus* spp. (VRE), *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* isolates, which are important in terms of hospital infections and also for our hospital, were included in the study. In addition, the periods and concentrations in which they were active were determined and interpreted with their activity in the time and concentration being used.

MATERIAL AND METHOD

Microorganisms

Clinical isolates were collected from Trakya University Hospital. Isolates were corrected to be *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* and *E. faecalis* by using Biomerieux Api® 20NE, Microgen® GN-ID A, Microgen® Staph-ID and Microgen® Strep-ID identification kits, respectively. After identification, isolates were stored in Microbank™ cryovials at -80°C.

Among thirty-one *K. pneumoniae* isolates, 14 were detected to have extended spectrum beta lactamase enzyme (ESBL). Fifteen MRSA isolates, 14 VRE isolates and 25 “carapenem and ciprofloxacin” resistant *A. baumannii* isolates were included in the study. Isolated strains were provided from different units of the hospital from different tissue samples.

Susceptibility Testing

Cefoxitin disc diffusion test, ESBL confirmatory test and microdilution methods were applied through the guidelines of CLSI M100-S25 to determine the susceptibilities of the isolates [17]. ESBL confirmatory test was applied to *K. pneumoniae* isolates and ceftazidim, ceftazidim/clavulanic-acid, cefotaxim and cefotaxim/ clavulanic-acid were used to confirm the enzyme activity [17]. Cefoxitin disc diffusion test was applied to *S. aureus* isolates to show methicillin resistance [17].

In microdilution method, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212 standard strains were used as quality control strains. Meropenem (Sigma), imipenem (Sigma), ciprofloxacin (Sigma), vancomycin (Biomatik), ampicillin (Biomatik), gentamicin (Sigma), and ceftazidim (Sigma) solutions were prepared and susceptibilities of the isolates through the agents were determined [17].

Disinfectant Efficacy Testing

P. aeruginosa ATCC 15442, *E. coli* ATCC 11229, *Proteus mirabilis* ATCC 14153, *K. pneumoniae* ATCC 4352, *S. aureus* ATCC 6538 quality control strains and the isolates were used. Commercial disinfectants containing orthophthalaldehyde, peracetic acid, sodium dichloroisocyanurate, isopropanol, ethanol, benzalkonium chloride, glucoprotamine, quaternary ammonium propionate, sodium hypochlorite which are used in Trakya University Hospital were included in the study. Since it is intended to investigate the effectiveness of the actual conditions applied at the hospital, commercial disinfectant agents were used in their packaged forms with the conditions applied in our hospital through the manufacturers' recommendations.

The disinfectants and conditions which the disinfectants are applied in our hospital are given in Table 1.

Table 1. Conditions which the disinfectants are applied in our hospital

Disinfectant	Purpose of disinfection	Active Ingredient	Formulation Tested	Application Procedure	Contact Time
D1	Medical devices	Orthophthalaldehyde	Undiluted	Immersing in the solution	5 min
D2	Medical devices	Peracetic acid	2%	Immersing in the solution	5 min
D3	Water tanks and surfaces exposed to organic pollution	Sodium dichloroisocyanurate	2 tablets/ 1 liter tab water	Throwing into water and/or immersing in the solution	10-15 min
D4	Surfaces	Isopropanol, Ethanol, Benzalkonium chloride, Glucoprotamine	Undiluted	Spraying and wiping on surfaces	-
D5	Clean medical instruments	Ethanol, quaternary ammonium propionate	Undiluted	Spraying on the surface of the instrument	-
D6	Hand [antiseptic]	Ethanol	Undiluted	Rubbing over the hands	30-45 seconds
D7	Surfaces	Calcium carbonate, anionic surfactant, sodium carbonate, benzyl alcohol	Undiluted	Wiping on surfaces and rinsing with water	-
D8	WC-Bath	Cationic surfactant and HCl	Undiluted	Squeezing on the curves of the surface	-
D9	Floors	Non-ionic and anionic active agent	100gr or 200gr /8 lt tab water	Wiping with floor mop	-
D10	Surfaces	Sodium hypochlorite	5%	Wiping with cloth or applying directly on the surface	-

Qualitative Suspension Test

Standard bacterial strains and clinical isolates were cultivated on Tryptic Soy Agar (TSA) (LabM) medium and incubated at 37°C for 18-24 hours. The third passage of the culture was used in the

qualitative suspension test. Solutions of disinfectants were prepared in at least three different concentrations. Stock solutions of the ready to use disinfectants were used as the first concentration without diluting. A stock solution of 2 times the application concentration was used for *D3* reach application concentration for this disinfectant as the $\frac{1}{4}$ dilution of the agent. All the disinfectant solutions were prepared fresh and tested with standard bacterial strains and clinical isolates at 3, 5, 10, 15, 20 and 30 minutes in clean and dirty conditions.

Qualitative suspension test was applied through the guidelines of TS/EN/1040:2005 (formerly TS/EN/1040:1999) [18]. The method was modified by using D/E Neutralizing Broth (Difco) instead of adding a neutralizing agent in a medium and 24 wells sterile microplates were used as reported by Kawamura-Sato et al. [19].

Bacterial inoculum was prepared at McFarland 0.5 concentrations ($1.5-5 \times 10^8$ CFU/mL) and these bacterial suspensions were used in the study. Disinfectant solutions were prepared with hard water.

Preparation of Hard Water

Solution A: 19.84g anhydrous $MgCl_2$ and 46.24g anhydrous $CaCl_2$ are dissolved in sterile distilled water with the final volume of 1000mL.

Solution B: 35.02g $NaHCO_3$ is dissolved in sterile distilled water with the final volume of 1000mL. 600mL of water was added to 6mL of solution A, and then 8mL of B was added to this solution. Sterile distilled water was added up to 1000mL. This mixture was filtered through a milipore filter and sterilized. pH of the solution was set to 7.0 ± 0.2 .

Applications were performed at 21°C temperature. Bovine albumin (Merck) solution was used at different concentrations for clean or dirty conditions as a decaying agent. Bovine albumin solution for clean conditions was prepared at 0.3g/L, and for dirty conditions at 3g/L concentrations. All disinfectants were tested in both clean and dirty conditions.

Stock solutions of ready to use disinfectants were used without diluting. *D3* and *D10* were diluted with hard water.

The prepared disinfectant solutions were diluted with hard water containing appropriate amount of BSA for clean and dirty conditions. Dilution was performed in sterile 24-well microplates. There was 1mL of disinfectant solution in every well of the plates after dilution. 100 μ L, McFarland 0.5 density inoculum of bacteria were added to the wells and time was started immediately. After the selected contact time, the sample was transferred to D/E Neutralizing Broth to stop the disinfectant activity. After incubation at 37°C for 18-24 hours, changing of the medium color from purple to yellow was considered as growth for fermentative bacteria. *A. baumannii* was recultivated on Tryptic Soy Agar to ensure growth.

If there was growth; the disinfectant was considered to be ineffective in the tested concentration at the tested time, and if there was no growth, the disinfectant was considered to be effective.

Statistical Analyses

When 10 different disinfectants were applied on 4 different bacterial groups, it was revealed that there was a significant difference between the bacterial groups by Oneway ANOVA analysis ($p < 0.05$).

RESULT AND DISCUSSION

In our study, the effect of disinfectants on resistant bacterial isolates at 3 different concentrations, including the concentration applied in the hospital, in clean and dirty conditions, and in different contact times was investigated.

As a result it was determined that all isolates were susceptible in the application conditions. However; peracetic acid, sodium dichloroisocyanurate, non-ionic active agent and sodium hypochlorite containing disinfectants being used in the hospital were not effective against some strains isolated from the hospital. Numbers of isolates susceptible to disinfectants in dirty and clean conditions at different contact times are shown in Table 2.

There are certain numbers of microorganisms that can be killed by a certain amount of disinfectant at a certain concentration. As the number of microorganisms increases, the concentration of disinfectant or contact time increases [2]. For these reasons, standardization has been carried out in the tests for the purpose of evaluating disinfectant activity. While showing differences between countries; parameters such as standard microorganism species, inoculum of microorganism, presence of organic matter, ambient temperature and pH, and neutralization agents have been standardized [20-24]. In addition, the effects of environmental conditions on disinfectant activity were investigated in scientific studies and it was shown that different results were obtained for different species of microorganisms [25-27].

Various methods have been developed to determine the effectiveness of disinfectant agents. The tests that determine the effectiveness of disinfectants may be disinfectant activity tests or specific tests for the purpose. All methods have the same purpose. One or more of these methods are used depending on the organic or inorganic contaminants that may be present in the environment, the disinfectant application area, the microorganism spectrum to which it may be effective [3, 6, 10, 14, 15, 18, 20, 23]. Suspension tests belong to the activity tests [3, 10, 22] and are frequently used to determine the effectiveness of a disinfectant against bacteria after a specific contact period [15, 20, 28, 29, 31, 32].

Hospital infections are an important problem in our country as well as in the whole world, and attempts are being made to develop appropriate disinfection policies to prevent this problem. Proper selection and application of disinfectants and antiseptics may improve the quality of treatment by reducing the unnecessary use of antibiotics and the length of hospital stay. It is therefore very important to investigate efficacy of the disinfectants prior to the supply of these substances. However, disinfectants used in hospitals should also be effective against microorganisms associated with hospital infection [19, 32, 33].

Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from different hospital environments may differ from each other. Okesola and Olola investigated the efficacy of disinfectants on *P. aeruginosa* isolated from the same hospital and determined resistant and intermediate susceptible isolates to Chloroxylenol (Dettol) and sodium hypochlorite (JIK) containing disinfectants. They suggested not using or changing the application conditions of these two disinfectants [34].

Inan et al. have investigated the disinfectant efficacy to 10 isolates from each of *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter sp.* and MRSA isolated from their hospital. They reported that ethyl alcohol was effective to MRSA isolates, *Acinetobacter* isolates and other isolates after 1st minute, 5th minute and 20th minute exposure, respectively. While 10% solution of povidon iodure was detected to be effective to all isolates, 1% solution was not effective to MRSA isolates at 1 and 5 minutes exposure. 1/25 diluted benzalkonium chloride was effective only to MRSA isolates. Phenolic compounds were effective after 20 minutes exposure and the most effective agents were determined to be sodium hypochlorite and glutaraldehyde to all isolates [35].

Eryilmaz M et al., have also studied the efficacy of some disinfectants to nosocomial infection causing bacteria by quantitative suspension test. All of the isolates from their hospital were found to be susceptible to 2% glutaraldehyde, 4% chlorhexidine gluconate, 7.5% povidone-iodine, 10% povidone-iodine and 70% 2-propanole in all conditions. However, they determined resistant isolates to 3% H₂O₂ even after 10 minutes exposure. As a result of this study they commented that the studied disinfectants being used in their hospital may be kept using; however 3% H₂O₂ should not be used because of the resistant isolates [2].

In our study, the effect of disinfectants on resistant bacterial isolates at 3 different concentrations, including the concentration applied in the hospital, in clean and dirty conditions, and in different contact times was investigated. As a result it was determined that all isolates were susceptible to D4, D5, D6, D7 and D8 in the application concentration and time, in both dirty and clean conditions. So, it has been determined that these disinfectants are efficient for disinfection in our hospital.

D4 contains glucoprotamine as the active ingredient and Tyskiet al., who investigated the activity of glucoprotamine not only on standard strains but also on clinical isolates, reported that it was effective to all bacterial and fungal isolates at short time intervals [36]. This finding is also compatible with the results of our study.

All bacterial isolates were susceptible to D1 in the stock solution, in both clean and dirty conditions at 5 minutes application. However, 10 *Acinetobacter* isolates were determined not to be susceptible to this agent in the ¼ diluted concentration of the stock solution in dirty conditions at 5, 10, 15 minutes applications. In clean conditions, the number of non-susceptible *Acinetobacter* isolates were 6, 4 and 3, at 5, 10, 15 minutes intervals, respectively. While 3 of the ESBL isolates were resistant to the ½ diluted concentrations in both dirty and clean conditions up to 15 minutes, all ESBL isolates were

resistant to D1 in $\frac{1}{4}$ diluted concentrations. MRSA and VRE isolates were determined to be susceptible to this disinfectant in all conditions. These findings show that D1 is an effective disinfectant when the stock solution is used as applied in our hospital.

Table 2. Number of isolates susceptible to disinfectants in dirty and clean conditions at different contact times

Disinfectant	Condition	Dilution	Bacteria	Time (Minutes)					
				3'	5'	10'	15'	20'	30'
D1	Dirty	1	K	14	14	14	14	14	14
			A	25	25	25	25	25	25
			E	15	15	15	15	15	15
			S	14	14	14	14	14	14
		$\frac{1}{2}$	K	10	11	11	11	14	14
			A	24	25	25	25	25	25
			E	15	15	15	15	15	15
			S	14	14	14	14	14	14
		$\frac{1}{4}$	K	0	0	0	0	14	14
			A	13	15	15	15	25	25
			E	15	15	15	15	15	15
			S	14	14	14	14	14	14
	Clean	1	K	14	14	14	14	14	14
			A	25	25	25	25	25	25
			E	15	15	15	15	15	15
			S	14	14	14	14	14	14
		$\frac{1}{2}$	K	10	10	11	11	14	14
			A	25	25	25	25	25	25
			E	15	15	15	15	15	15
			S	14	14	14	14	14	14
		$\frac{1}{4}$	K	0	0	0	0	14	14
			A	17	19	21	22	25	25
			E	15	15	15	15	15	15
			S	14	14	14	14	14	14
D2	Dirty	1	K	0	0	11	11	12	13
			A	1	1	6	8	10	13
			E	0	0	15	15	15	15
			S	0	0	14	14	14	14
		$\frac{1}{2}$	K	0	0	6	5	5	6
			A	0	0	0	0	0	0
			E	0	0	6	9	9	11
			S	0	0	1	6	6	9
		$\frac{1}{4}$	K	0	0	0	0	1	4
			A	0	0	0	0	0	0
			E	0	0	3	3	3	4
			S	0	0	0	0	0	5
	Clean	1	K	0	0	12	13	13	13
			A	1	1	9	12	17	20
			E	0	0	15	15	15	15
			S	0	0	14	14	14	14
		$\frac{1}{2}$	K	0	0	3	7	7	9
			A	1	1	1	1	1	1

Table 2 (continued). Number of isolates susceptible to disinfectants in dirty and clean conditions at different contact times.

		$\frac{1}{4}$	E	0	0	15	15	15	15		
			S	0	0	14	14	14	14		
			K	0	0	0	2	2	3		
			A	0	0	0	0	0	0		
			E	0	0	6	10	11	11		
			S	0	0	5	13	14	14		
		D3	Dirty	1	K	0	0	1	1	1	1
					A	0	0	0	2	6	9
					E	0	0	12	15	15	15
				$\frac{1}{2}$	S	1	1	14	14	14	14
					K	0	0	0	0	1	1
					A	0	0	0	0	2	5
$\frac{1}{4}$	E		0	0	2	2	2	2			
	S		1	1	14	14	14	14			
	K		0	0	0	0	1	1			
Clean	1		A	0	0	0	0	0	0		
			E	0	0	2	2	2	2		
			S	1	1	14	14	14	14		
	$\frac{1}{2}$	K	0	0	1	1	1	1			
		A	0	0	5	8	10	14			
		E	0	0	15	15	15	15			
$\frac{1}{4}$	S	1	1	14	14	14	14				
	K	0	0	1	1	1	1				
	A	0	0	1	2	2	6				
D9	Dirty	1	E	0	0	15	15	15	15		
			S	1	1	14	14	14	14		
			K	0	0	13	13	13	13		
		$\frac{1}{2}$	A	0	0	1	1	1	1		
			E	1	1	15	15	15	15		
			S	1	1	14	14	14	14		
	$\frac{1}{4}$	K	0	0	8	8	8	8			
		A	0	0	1	1	1	1			
		E	1	1	15	15	15	15			
	Clean	1	S	1	1	14	14	14	14		
			K	0	0	7	7	7	7		
			A	0	0	1	1	1	1		
$\frac{1}{2}$		E	1	1	14	15	15	15			
		S	1	1	14	14	14	14			
		K	0	0	13	13	13	13			
$\frac{1}{4}$	A	0	0	1	1	1	1				
	E	1	1	15	15	15	15				
	S	1	1	14	14	14	14				
		$\frac{1}{4}$	K	0	0	8	8	8	8		
			A	0	0	1	1	1	1		
		$\frac{1}{4}$	E	1	1	15	15	15	15		
			S	1	1	14	14	14	14		
		$\frac{1}{4}$	K	0	0	6	6	6	6		
			A	0	0	1	1	1	1		

Table 2 (continued). Number of isolates susceptible to disinfectants in dirty and clean conditions at different contact times.

D10	Dirty	1/2	E	1	1	15	15	15	15	
			S	1	1	14	14	14	14	
		1/4	K	0	0	3	3	3	5	
			A	0	0	3	4	6	12	
			E	0	0	15	15	15	15	
			S	1	1	14	14	14	14	
		1/8	K	0	0	0	0	0	0	
			A	0	0	1	2	4	8	
			E	0	0	15	15	15	15	
			S	1	1	13	13	13	13	
		Clean	1/2	K	0	0	0	0	0	0
				A	0	0	0	0	0	2
				E	0	0	5	6	8	11
				S	1	1	13	13	13	13
			1/4	K	1	1	10	10	10	11
				A	1	1	15	19	19	23
				E	0	0	15	15	15	15
				S	1	1	14	14	14	14
			1/8	K	0	0	0	0	0	1
				A	0	0	3	4	6	9
				E	0	0	15	15	15	15
				S	1	1	14	14	14	14
		1/8	K	0	0	0	0	0	0	
			A	0	0	2	2	4	7	
E	0		0	15	15	15	15			
S	1		1	13	14	14	14			

*K: ESBL isolates, A: Carapenem and ciprofloxacin resistant *A. baumannii* isolates, E: VRE isolates, S: MRSA isolates

Peracetic acid is used in the disinfection or sterilization of critical instruments requiring high level disinfection and its effect on bacterial biofilm and bacterial spores has also been reported [25,37]. Although, there is not much information about the effect of peracetic acid against resistant microorganisms, some studies have reported some limitations of peracetic acid against resistant bacteria [38, 39]. D2 has been used in our hospital by immersing the medical devices in the stock solution (2% concentration) of the disinfectant for 5 minutes. In our study, the 1/2 and 1/4 diluted concentrations of this stock solution was also included in the study. Unfortunately, it was determined that the applied condition was not effective to any of the isolates except 1 *A. baumannii* isolate, in neither dirty nor clean conditions. However, it was efficient to all MRSA and VRE isolates in case of 10 minutes application. 5 of the *A. baumannii* isolates were found to be resistant even after 30 minutes application. After 10 minutes 2 of the ESBL isolates and after 15, 20 and 30 minutes 1 of the ESBL isolate were resistant to D2. The disinfectant was effective to the standard strains; *S. aureus* ATCC 6538, *K. pneumoniae* ATCC 4352 and *E. coli* ATCC 11229 after 10 minutes application. As a result of our study it is not recommended to be used in the hospital environment in the recommended conditions because of its insufficiency to the multi-drug resistant isolates. Supporting our findings, Kampf et al., in their review

of the literature, stated that peracetic acid used in endoscope disinfection is insufficient and resistant *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* cases are seen [38]. However, in another study, the effect of two commercially available disinfectants containing peracetic acid on the stainless steel surfaces contaminated with *S. aureus*, *E. coli* and *Candida albicans* was investigated. It was reported that there was no significant difference between these disinfectants in terms of microbial efficacy but D2 lost its stability from the fourth day [39]. So, the reason why D2 was not effective could be the loss of stability. In hospitals, as in many hospitals, disinfectants are supplied in their largest packages in order to be cost effective. In this case, opened disinfectants may cause deterioration of their stability due to various reasons during use. According to the results of our study and in accordance with this finding, our proposal is to recommend that, packaging size of the disinfectant depending on the frequency of use of commercially available disinfectants should also be mentioned in their manuals.

D9 and D10 are surface cleaners, so after wiping the surfaces, time is not calculated. D9 has been using on floor cleaning by wiping the floor with a cloth or applied directly. Except one of the isolates, all *K. pneumoniae*, MRSA and VRE isolates were detected to be susceptible to the first concentration of the disinfectant after 10 minutes application. However, when the dilution factor increases the number of the resistant isolates increased. *A. baumannii* isolates were resistant even to the first concentration of the disinfectant. So, while the disinfectant is efficient for MRSA, VRE and ESBL isolates after 10 minutes, it does not have any effect on *A. Baumannii* isolates, which is a great problem for nosocomial infections.

D10 contains 5% sodium hypochlorite and has been used for wiping the floor with a mop. The application conditions were enough to kill the VRE and MRSA after 10 minutes; however, there were still resistant ESBL and *A. baumannii* isolates even after 30 minutes application. Sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) has been an alternative for sodium hypochlorite due to its low toxicity, its chlorine level being more stable and not being corrosive recently [40,41].

Type of the strain, virulence factors of the strain or the inappropriate storage conditions may have led the disinfectants lose its ability. But what ever happened as the reason, 4 of the studied disinfectants being used in the hospital are not effective against some drug resistant strains isolated from the hospital and also by statistical analyze, the difference of the effect on different bacterial isolates was found to be significant ($p < 0,05$).

Regardless of the number of isolates, even the resistance of a single isolate to the application conditions of a disinfectant may lead to selection and proliferation of the strains which are not affected by the disinfectants used in the hospital and this may cause hospital infections. Our results might provide a reference to help selecting appropriate disinfectants for cleaning and disinfection in hospitals.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was financed by Trakya University Scientific Research Projects (TUBAP) Unit, 2015/125 coded project. We would like to thank to “Trakya University Health Centre for Medical Research and Practice” for providing the isolates and the disinfectant samples.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception: Ç.Y., F.K.O.; Design: Ç.Y., F.K.O.; Supervision: Ç.Y., F.K.O.; Resources: F.K.O.; Materials: Ç.Y.; Data collection and/or processing: Ç.Y., F.K.O., S.Ö.; Analysis and/or interpretation: Ç.Y., F.K.O.; Literature search: Ç.Y.; Writing manuscript: F.K.O., S.Ö.; Critical review: Ç.Y., F.K.O., S.Ö.; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

The study was approved by Trakya University Scientific Research and Ethics Committee 2015/57-05/04 numbered permission.

REFERENCES

1. Günaydın, M., Esen, S., Karadağ, A., Ünal, N., Yanık, K., Odabaşı, H., Birinci, A. (2014). In vitro antimicrobial activity of Medilox® super-oxidized water. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 13, 29-34. [CrossRef]
2. Eryılmaz, M., Akın, A., Akan-Arıkan, O. (2011). Investigation of the efficacy of some disinfectants against Nosocomial *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp. isolates. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 45(3), 454-460.
3. Çağlar, K. (2009). Dezenfektan Etkinliğinin Ölçülmesinde Örnek Modeller (El Dezenfektanı ve Yüzey Dezenfektanı), DAS Kongre Kitabı, Bilimsel Tıp Yayınevi, p. 139-148.
4. Otter, J.A., Yezli, S., Salkeld, J.A.G., French, G.L., Path, F.R.C. (2013). Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. *American Journal of Infection Control*, 41, 6-11. [CrossRef]
5. Samastı, M. (2008). Hastanelerde Dezenfeksiyon Kullanım Esasları, Yapılan Hatalar: Hastane Enfeksiyonları Koruma ve Kontrol Sempozyum Dizisi, 60, 143-168.

6. McDonnell, S., Russell, D. (1999). Antiseptic and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147-179. [CrossRef]
7. Şencan, I. (2003). Dezenfektanlara Direnç Sorunu ve Pratik Önemi, DAS Kongre Kitabı, Bilimsel Tıp Yayınevi.
8. Kramer, A., Schwebke, I., Kampf, G. (2006). How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*, 6, 130. [CrossRef]
9. Ünal, N., Yanık, K., Karadağ, A., Odabaşı, H., Esen, S., Günaydin, M. (2014). Evaluation of the efficacy of akacid plus® fogging in eradicating causative microorganism in nosocomial infections. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7(12), 5867-5871.
10. Abbasoğlu, U. (2009). Dezenfektanlar: Sınıflama ve Amaca Uygun Kullanımı, DAS Kongre Kitabı, Bilimsel Tıp Yayınevi.
11. İnan, A., Şenbayrak- Akçay, S., Özyürek, S.C., Tekin, S.Z., Erdoğan, P., Erdem, I., Engin, D.O., Ceren, N., Göktaş, P. (2009). The efficacy of various antiseptics and disinfectants against some nosocomial pathogens. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 39(3-4), 97-102.
12. Harbarth, S., Tuan Soh, S., Horner, C., Wilcox, M.H. (2014). Is reduced susceptibility to disinfectants and antiseptics a risk in healthcare settings? A point/counterpoint review. *Journal of Hospital Infection*, 87, 194 –202. [CrossRef]
13. Hastane Enfeksiyonları ile Mücadele, Sayıştay Raporu, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, (2009). From http://www.hider.org.tr/managete/fu_folder/PerformansDenetimi.pdf.
14. Fıçıcı, S.E., Durmaz, G., İlhan, S., Akgün, Y., Kosgeroğlu, N. (2002). Bactericidal effects of commonly used antiseptics/disinfectants against nosocomial pathogens and relationship between antibacterial and biocide resistance. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 36(3-4), 259-269.
15. İrikli, S., Tatman, Otkun M. (2007). Investigation of in-vitro antimicrobial activities of some antiseptics and disinfectants. *Turkish Journal of Infection*, 21(1), 7-13.
16. Hedin, G., Blomkvist, A., Janson, M., Lindblom, A. (2012). Occurrence of potentially pathogenic bacteria on the hands of hospital patients before and after the introduction of patient hand disinfection. *APMIS Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*, 120, 802–807. [CrossRef]
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS). (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 25th Informational Supplement. CLSI M100-S25, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA.
18. Turkish Standard, TS/EN/1040:2005. (2005). Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics - Test method and requirements (phase 1). 1st ed. Ankara.
19. Kawamura-Sato, K., Wachino, J., Kondo, T., Ito, H., Arakawa, Y. (2010). Correlation between reduced susceptibility to disinfectants and multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 1975–1983. [CrossRef]

20. Nakipoğlu, Y., Gürler, B. (2004). An investigation on antibacterial efficacy of various disinfectants and antiseptics. *Journal of ANKEM*, 18(4), 220-223.
21. West, A.M., Teska, P.J., Lineback, C.B., Oliver, H.F. (2018). Strain, disinfectant, concentration, and contact time quantitatively impact disinfectant efficacy. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7, 49. [\[CrossRef\]](#)
22. Sultan, N. (2009). Dezenfektan Aktivitesini Etkileyen Faktörler ve Dezenfektan Etkinliğinin Değerlendirilmesi, DAS Kongre Kitabı, Bilimsel Tıp Yayınevi, p. 121-137.
23. Erbay, A., Ergönül, O., Esener, H., Çolpan, A., Dokuzoğuz, B. (2002). Resistance of meticillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains to various disinfectants. *Turkish Journal of Hospital Infections*, 6, 191-194.
24. Abbasoğlu, U. (2011). Dezenfeksiyon ve Dezenfektanlar, In: U. Abbasoğlu and A. Çevikbaş (Eds.), Efil Yayınevi: Ankara, (pp. 71-83).
25. Sudhaus, N., Nagengast, H., Pina-Perez, M.C., Martinez, A. (2014). Effectiveness of a peracetic acid-based disinfectant against spores of *Bacillus cereus* under different environmental conditions. *Food Control*, 39, 1-7. [\[CrossRef\]](#)
26. Abdallah, M., Chataigne, G., Ferreira, Theret P., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., Chihib, N.E. (2014). Effect of growth temperature, surface type and incubation time on the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilms to disinfectants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 2597-2607. [\[CrossRef\]](#)
27. Raffellini, S., Schenk, M., Guerrero, S., Alzamora, S.M. (2011). Kinetics of *Escherichia coli* inactivation employing hydrogen peroxide at varying temperatures, pH and concentrations. *Food Control*, 22, 920-932. [\[CrossRef\]](#)
28. Macias, J.H., Arreguin, V., Munoz, J.M., Alvarez, J.A., Mosqueda, J.L., Macias, A.E. (2013). Chlorhexidine is a better antiseptic than povidone iodine and sodium hypochlorite because of its substantive effect. *American Journal of Infection Control*, 41, 634-637. [\[CrossRef\]](#)
29. Kampf, G., Höfer, M., Wendt, C. (1999). Efficacy of hand disinfectants against vancomycin-resistant enterococci in vitro. *Journal of Hospital Infection*, 42, 143-150. [\[CrossRef\]](#)
30. Özalp, M., Ekizoğlu, M., Kılıç, E. (2007). Evaluation of bactericidal activity of certain glutaraldehyde free disinfectants used in the disinfection of endoscopes and surgical devices by a quantitative suspension test. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 27(2), 131-138.
31. Sheraba, N.S., Yassin, A.S., Fahmy, A., Aminw, M.A. (2014). Quantitative suspension tests for the evaluation of bactericidal, fungicidal and sporicidal effects of biocides used in vaccine production facility. *African Journal of Microbiology Research*, 8(5), 417-424. [\[CrossRef\]](#)
32. Ünal, N., Karadağ, A., Yanık, K., Bilgin, K., Günaydın, M., Birinci, A. (2014). Analysis of in vitro efficiency of electrolyzed water against fungi species frequently detected in nosocomial infections. *Universal Journal of Microbiology Research*, 2(3), 50-55.
33. Rutala, W.A., Weber, D.J. (2013). Disinfection and sterilization: An overview. *American Journal of Infection Control*, 41(5), S2-S5. [\[CrossRef\]](#)

34. Okesola, A.O., Olola, A.F. (2011). The efficacy of the commonly used hospital disinfectants on *Pseudomonas aeruginosa*. *International Research Journal of Microbiology*, 2(7), 226-229.
35. İnan, A., Şenbayrak, Akçay S., Özyürek, S.Ç., Tekin, S.Z., Erdoğan, P., Erdem, İ., Engin, D.Ö., Ceran, N., Göktaş, P. (2009). The efficacy of various antiseptics and disinfectants against some nosocomial pathogens. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 39(3-4), 97-102.
36. Tyski, S., Grzybowska, W., Grzeszczuk, S., Leszczynski, P., Staniszewska, M., Röhm-Rodowald, E., Jakimiak, B. (2009). Antimicrobial activity of glucoprotamin-containing disinfectants. *Polish Journal of Microbiology*, 58(4), 347-353.
37. Arias-Moliz, M.T., Ordinola-Zapata, R., Baca, P., Ruiz-Linares, M., Garcia, GarciaE., Hungaro, Duarte M.A., Monteiro, Bramante C., Ferrer-Luque, C.M. (2015). Antimicrobial activity of chlorhexidine, peracetic acid and sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against *Enterococcus faecalis* biofilms. *International Endodontic Journal*, 48(12), 1188-1193. [\[CrossRef\]](#)
38. Kampf, G., Fliss, P.M., Martiny, H. (2014). Is peracetic acid suitable for the cleaning step of reprocessing flexible endoscopes? *World Journal of Gastrointestinal Endoscopy*, 6(9), 390-406. [\[CrossRef\]](#)
39. Costa, S.A.S., Paula, O.F.P., Silva, C.R.G., Leao, M.V.P., Santos, S.S.F. (2015). Stability of antimicrobial activity of peracetic acid solutions used in the final disinfection process. *Brazilian Oral Research (online)*, 29(1), 1-6. [\[CrossRef\]](#)
40. Adukwu, E.C., Allen, S.C., Phillip, C.A. (2015). A comparison of the sensitivity of four *staphylococcus aureus* isolates to two chlorine-based disinfectants and an eco-friendly commercially available cleaning agent. *International Journal of Environmental Health Research*, 25(2), 115-125. [\[CrossRef\]](#)
41. Clasen, T., Edmondson, P. (2006). Sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) tablets as an alternative to sodium hypochlorite for the routine treatment of drinking water at the household level. *International Journal of Environmental Health Research*, 209, 173-181. [\[CrossRef\]](#)



MOLECULAR DOCKING STRATEGY FOR MULTI-TARGET INHIBITOR DISCOVERY OF SELECTED PLANT CONSTITUENTS IN *BAUHINIA ACUMINATA*

BAUHINIA ACUMINATA'DAKİ SEÇİLMİŞ FİTO BİLEŞENLERİN ÇOK HEDEFLİ
İNHİBİTÖR KEŞFİ İÇİN MOLEKÜLER YERLEŞTİRME STRATEJİSİ

Muni Sireesha SUNKARA¹, Vinutha KUCHANA¹, Neelima KUDUMULA^{1*}

¹Osmania University, Sarojini Naidu Vanita Pharmacy Mahavidyalaya, Department of Pharmaceutical
Chemistry, 500017, Hyderabad, India

ABSTRACT

Objective: *Traditional medicine is often considered to be a kind of complementary or alternative medicine (CAM) nowadays. Therefore, documenting and identifying the herbs that are effective in treating various diseases is vital for future disease control programs. This study aims to perform a molecular docking analysis of the thirteen plant components in Bauhinia acuminata against the target proteins in lung cancer (PDB IDs: 2ITY), breast cancer (1A52), diabetes (3L4U), obesity (IT02), inflammation (5COX) and corona viral infections (6VYO).*

Material and Method: *All the plant components used for the present study were retrieved from the plant Bauhinia acuminata and were evaluated for their biological activity results using molinspiration. Further in-silico docking analysis was performed using AutoDock Vina software and the binding interactions were visualized using Discovery studio program.*

Result and Discussion: *The docking scores and analysis of the interactions of the plant components with targets suggest that all the selected plant components showed excellent binding to the chosen targets when compared to that of the standard drugs. As a result of the docking process on 6 different targets, the selected plant components like Quercetin, Beta-sitosterol, and Rheagenine were observed to show good binding energy values against all the 5 targets except 6VYO as shown in (Table 9). These results can further pave the way for getting better insights in identifying and designing potential lead candidates.*

Keywords: *AutoDock Vina, Bauhinia acuminata, discovery studio, molecular docking, plant components*

ÖZ

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Neelima Kudumula
e-mail / e-posta: neelima_kudumula@yahoo.com, **Phone / Tel.:** +919502792574

Submitted / Gönderilme: 25.08.2021

Accepted / Kabul: 16.12.2021

Amaç: Günümüzde geleneksel tıp genellikle bir tür tamamlayıcı veya alternatif tıp (CAM) olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, çeşitli hastalıkların tedavisinde etkili olan bitkilerin belgelenmesi ve tanımlanması gelecekteki hastalık kontrol programları için hayati öneme sahiptir. Bu çalışma *Bauhiniaacuminata*'daki on üç bitki bileşeninin akciğer kanseri (PDB IDs: 2ITY), meme kanseri (1A52), diyabet (3L4U), obezite (IT02), inflamasyon (5COX) ve korona viral enfeksiyonlarındaki (6VYO) hedef proteinlere karşı moleküler kenetlenme analizini gerçekleştirmeyi amaçlamaktadır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada kullanılan tüm bitki bileşenleri *Bauhiniaacuminata* bitkisinden alınmış ve molinspirasyon kullanılarak biyolojik aktivite sonuçları açısından değerlendirilmiştir. Ayrıca AutoDockVina yazılımı kullanılarak siliko içi yerleştirme analizi yapıldı ve bağlanma etkileşimleri Discoverystudio programı kullanılarak görselleştirildi.

Sonuç ve Tartışma: Yerleştirme puanları ve bitki bileşenlerinin hedeflerle etkileşimlerinin analizi, seçilen tüm bitki bileşenlerinin standart ilaçlarına kıyasla seçilen hedeflere mükemmel bağlanma gösterdiğini göstermektedir. 6 Farklı hedefe kenetlenme işlemi sonucunda, Quercetin, Beta-sitosterol ve Rheagenin gibi seçilen bitki bileşenlerinin, gösterildiği gibi 6VYO hariç tüm 5 hedefe karşı iyi bağlanma enerjisi değerleri gösterdiği gözlenmiştir (Tablo 9). Bu sonuçlar potansiyel potansiyel adayları belirleme ve tasarlama konusunda daha iyi kavrayışlar elde etmenin önünü daha da açabilir.

Anahtar Kelimeler: AutoDock Vina, *Bauhinia acuminata*, bitki bileşenleri, discovery studio, moleküler yerleştirme

INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) defines traditional medicine as: “the sum of total knowledge, practices, and skills based on the historical theories, beliefs, and experiences in indigenous to various cultures that are used to maintain the human or animal health and to prevent, diagnose, improve, or treat physical/mental illnesses” [1].

Herbal remedies are widely used in both developing and developed world countries to treat various illnesses indispensable [2]. The WHO reported, to treat their illnesses about 80% of the world's population are depending primarily on traditional medicines. Traditional medicine is often considered to be a kind of complementary or alternative medicine (CAM) [3] nowadays. Herbal medicines include herbal preparations, raw herbs, and finished herbal products, as well as additives derived from different kinds of plant parts/herbs. Many advantages are shown by the active components of these herbs, like lower toxicity and allergenicity than when compared to some commercial medications, regulating immunological responses, and causing viral destruction [4]. In the research trials [5], various common herbs have been used to prevent viral infections, and their efficacy has been demonstrated. Therefore, documenting and identifying the herbs that are effective in treating various contagious diseases is vital for future disease control programs.

Bauhinia acuminata is an ever green shrub belonging to the family of Fabaceae grown in the areas of South east Asia such as Malaysia, Indonesia, or the Philippines. For conventional drugs, bark, leaves, stem, blooms, and roots have been utilized. In India, it is a traditional plant, and its extract in studies have shown that *Bauhinia acuminata* have significant biological activities such as in the treatment of lung cancer [6], breast cancer [7], anti-diabetic [8], anti-obesity [9], anti-inflammatory [10]. Based on

the reported anti-lung cancer, anti-breast, anti-diabetic, anti-obesity activities, molecular docking studies have been planned to establish the contribution of the activity by the plant components.

Bauhinia acuminata has been chemically studied and reported wherein the important chemical constituents isolated from *Bauhinia acuminata* which are depicted in (Table 1) are chosen for our studies. All the plant components will be evaluated in this study on the docking behavior of EGFR [11], ESTROGEN ALPHA RECEPTOR [12], ALPHA GLUCOSIDASE [13], HMG COA [14], 5COX [15], SAR COV-2 [16] using an *In silico* molecular docking analysis with AutoDock Vina software and also an investigation on the enzymes binding sites using Discovery Studio Version 3.5.

MATERIAL AND METHOD

The X-ray crystallographic structures of six different targets 2ITY (Lung cancer), 1A52 (Breast cancer), 3L4U (Diabetes), IT02 (Obesity), 5COX (Inflammation), 6VYO (Corona Virus infection) were retrieved from protein databank and saved as a Brookhaven protein data bank file [17]. For all the six targets, the standard ligands were selected from the literature review and downloaded from Pubchem Database as depicted in (Figure 1). The 2D structures of all thirteen plant components were sketched using ACD/Chemsketch Software as shown in (Table 1). The generated ligands were cleaned and performed 3D optimization and then saved in the MDL Molfile format. The ligands were then converted to a PDB file format using the Open Babel chemistry toolbox. AutoDock Vina [18] (Academic version.1.2.0, Molecular Graphics Lab (now CCSC) at The Scripps Research Institute) was used for molecular docking studies. A grid was generated around the co-crystallized ligand. The coordinates were generated with the help of MGL Tools and Pharmit: interactive exploration of chemical space [19]. Prepared pdbqt files for both target and ligands by adding Polar hydrogens and Gasteiger charges. Created in-house batch file of ligands and target and then docking was performed in the absence of water molecules for all the plant components [20]. The molecules were then analyzed after docking and visualized in the Discovery Studio Version 3.5 [21] for the interactions with the active site amino acids. Further to optimize the docking process all the crystal structures of the targets compared with the standard ligands. Ligand interactions were shown in (Figure 1 to Figure 6).

RESULT AND DISCUSSION

Bioactivity score is a computational approach that can be used to determine whether or not a particular molecule is similar to the known drugs in its structural features and molecular properties. According to the bioactivity score, if >0 is active; if $(-5.0 \text{ to } -0.0)$ is moderately active, and if <-5.0 is inactive. In the present study, all the thirteen plant components of *Bauhinia acuminata* showed active scores (>0) toward enzyme inhibitors descriptors. However, for other descriptors, these compounds

exhibited active to moderate active scores with none showing inactive score (≤ -5.0), as shown in (Table 2) which is already reported and is considered for our present work [22].

Table 1. Names and structures of the plant constituents of *Bauhina acuminata*

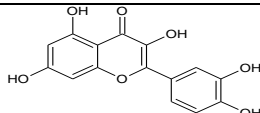
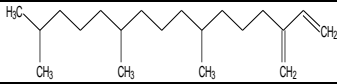
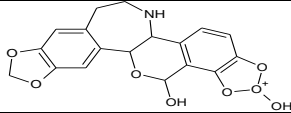


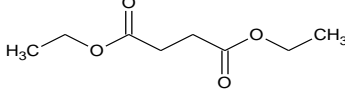
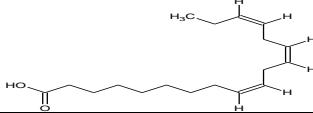
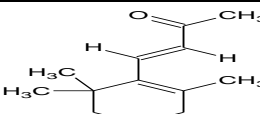
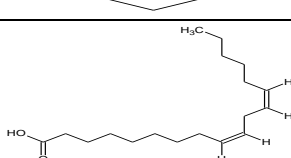
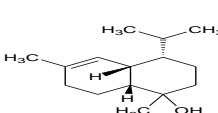
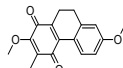
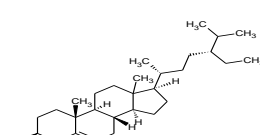
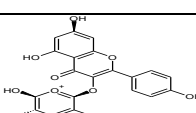
S.No	Plantconstituent	Structure
1	Quercetin	
2	Neophytadiene	
3	Rheagenine	
4	Alpha humulene	
5	Isoaromadendrene epoxide	
6	Butanedioic acid diethyl ester	
7	9,12,15-octadecatrienoic acid	
8	Beta-ionone	
9	9,12-octadecadienoic acid	
10	Alpha muurolol	
11	Bauhinione	
12	Beta-sitosterol	
13	Kaempferol-3-glucoside	

Table 2. Computed biological activity results of the plant constituents of *Bauhinia acuminata* by molinspiration

S.No	Plant Constituent	GPCR Ligand	Ion Channel Modulator	Kinase Inhibitor	Nuclear Receptor Ligand	Protease Inhibitor	Enzyme Inhibitor
1	Quercetin	-0.06	-0.19	0.28	0.36	-0.25	0.28
2	Neophytadiene	-0.12	-0.02	-0.35	0.2	-0.11	0.14
3	Rheagenine	0.21	0.13	-0.14	-0.09	0.02	0.17
4	Alpha humulene	-0.14	0.02	-0.93	0.34	-0.67	0.31
5	Isoaromadendrene oxide	-0.39	-0.37	-0.69	-0.01	0.02	-0.05
6	Butanedioic acid diethyl ester	-0.93	-0.35	-1.19	-0.91	-0.92	-0.46
7	9,12,15-octadecatrienoic acid	0.29	0.17	-0.16	0.31	0.12	0.38
8	Beta-ionone	-0.9	-0.26	-1.34	0.25	-0.79	0.28
9	9,12-octadecadienoic acid	0.29	0.17	-0.16	0.31	0.12	0.38
10	Alpha muurolol	-0.09	0.05	-0.87	0.39	-0.63	0.4
11	Bauhinione	-0.13	-0.18	0.1	0.06	-0.29	0.34
12	Beta-sitosterol	0.14	0.04	-0.51	0.73	0.07	0.51
13	Kaempferol-3-glucoside	0.06	-0.05	0.1	0.2	-0.05	0.41

In this *in silico* study, we have seen that thirteen plant components of *Bauhinia acuminata* exhibited the most negative value of docking score toward 2ITY, 1A52, 3L4U, IT02, 5COX means the best affinity was formed except for 6VYO. The docking scores and analysis of the interactions of the plant components with targets suggest that all the selected plant components showed excellent binding to the chosen targets when compared to that of the standard drugs.

Molecular docking interactions of all plant components with the target 1A52 were elucidated, and it was observed that various hydrogen bond interactions with aminoacids LEUA:387, ILEA:424, META:421, HISA:524, GLYA:521, GLUA:353, ARG:394, ARG:434, LEUA:384, META:388, META:343, THRA:347, LEUA:349, LEUA:354, LEUA:428, META:388, TRPA:383, ARG:515, GLUA:323, TRPA:393 were determined. Binding energies of all the compounds were found between -5.6 to -8.6 kcal/mol which were illustrated in (Table 3). All the plant components except Butanedioic acid diethyl ester showed more binding energies than the standard Tamoxifen (-6.2 kcal/mol).

All the plant components when docked with target 2ITY the following hydrogen bond interactions with aminoacids LEUA:844, PROA:794, LYSA:745, META:793, LYSA:745, LEUA:718, VALA:726, ASPA:855, GLYA:719, LEUA:844, GLNA:791, GLUA:762, THRA:854, SERA:720, ASPA:855 were determined. Binding energies of all the compounds were found between -5.1 to -9.2 kcal/mol which were illustrated in (Table 4). Among all compounds, Rheagenine, Beta-sitosterol, Bauhinione, Quercetin, Kaempferol-3-glucoside, and Isoaromadendrene epoxide showed more binding energies than the standard Erlotinib (-7.1 kcal/mol).

Table 3. Calculated binding energy values and interaction properties of the plant constituents of the phyto-constituents of *Bauhinia acuminata* the target 2ITY

S.No	Plant constituent	Binding Energy (kcal/mol)	Hydrogen Bond Interactions	Alkyl/ π Alkyl Interactions
1	Quercetin	-8	META:793, GLNA:791, ASPA:855, GLUA:762	LEUA:844, LEUA:718, ALAA:743, LYSA:745, VALA:726
2	Neophytadiene	-5.3	META:793	LEUA:844, LEUA:718, ALAA:743, VALA:726
3	Rheagenine	-9.2	LEUA:844, META:793	ALAA:743, VALA:726
4	Alpha humulene	-6.7	LEUA:718	VALA:726
5	Isoaromadendreneepoxide	-7.4	No Interactions	LEUA:858, LEUA:747, PHEA:723
6	Butanedioicaciddiethyl ester	-5.5	GLYA:719, SERA:720, PHEA:723, THRA:725, LYSA:745, ASPA:855	LEUA:718, VALA:726, CYSA:797
7	9,12,15-octadecatrienoic acid	-5.6	ASPA:855	VALA:726, LEUA:844, LEUA:718, LEUA:792, ALAA:743, META:793
8	Beta-ionone	-6.4	VALA:726, LEUA:844, META:793	No Interactions
9	9,12-octadecadienoic acid	-5.1	LYSA:745, ASPA:855, THRA:854	LEUA:844, LEUA:718, ALAA:743, VALA:726
10	Alpha muurolol	-6.8	No Interactions	LEUA:844, CYSA:775, LEUA:718, LEUA:792, ALAA:743, VALA:726
11	Bauhinione	-8.1	LYSA:745, ASPA:855	ALAA:743, LEUA:844, LEUA:718, VALA:726
12	Beta-sitosterol	-8.4	PROA:794, LEUA:844	ALAA:743, LEUA:718, VALA:726
13	Kaempferol-3-glucoside	-7.9	META:793, GLUA:762	LEUA:844, LEUA:718, ALAA:743, VALA:726, LYSA:745
14	ERLOTINIB (STANDARD)	-7.1	LYSA:745, THRA:854, GLYA:721, GLYA:719	ALAA:743, LEUA:844, LEUA:718, VALA:726

All the plant components when docked with target 3L4U target the following hydrogen bond interactions with amino acids ASPA:203, THRA:204, LYSA:480, THRA:205, GLUA:333, TYRA:299, HISA:600, ASPA:203, THRA:205, GLNA:603, ASPA:203, GLUA:404, ASPA:542, ARG:526, ARG:542, THRA:205, LYSA:480, PHEA:450, GLUA:404, ASPA:443. Binding energies of all the compounds were found between -5.3 to -8.3 kcal/mol which were illustrated in (Table 5). Among all compounds Rheagenine, Beta-sitosterol and Quercetin showed more binding energies than the standard Acarbose (-7.1 kcal/mol).

All the plant components made hydrogen bond interactions with aminoacids ASNB:375, GLYA:536, TYRB:373, ASNA:375, ASNB:375, PHEB:142, GLYB:225, GLNA:241, PROB:538, LYSA:333, GLYA:227, HISB:226, ASNA:375, GLNB:374, VALB:228, ARGB:376, TRPB:139, GLNA:241, ARGB:376, ARG:376, GLYA:225, LYSA:333, GLUB:140, LEUB:145, ASNB:144, LEUA:145, TYRA:373 in the active site of 5COX target. Binding energies of all the compounds were found between -5 to -9.9 kcal/mol which were illustrated in (Table 6). Among all compounds, Rheagenine, Beta-sitosterol, Bauhinione, Quercetin, Kaempferol-3-glucoside, Iso aromadendrene

epoxide, alpha Muurolol, Alpha Humulene, Beta-Ionone, and Butanedioic acid diethyl ester showed more binding energies than the standard Aspirin (-5.8 kcal/mol).

Table 4. Calculated binding energy values and interaction properties of the plant constituents of *Bauhinia acuminata* the target 1A52

S. No	Plant Constituent	Binding energy (kcal/mol)	Hydrogen Bond Interactions	Alkyl/ π Alkyl Interactions
1	Quercetin	-8.5	GLYA:521, GLUA:353, ARG:394	META:421, ILEA:424, LEUA:391, ALAA:350, LEUA:387, PHEA:404, LEUA:384
2	Neophytadiene	-6.8	LEUA:428, META:388, TRPA:383	LEUA:525, LEUA:387, LEUA:391, PHEA:404, ALAA:350, LEUA:384
3	Rheagenine	-7.2	No Interactions	LEUA:354, TRPA:383, ASPA:351
4	Alpha humulene	-8	LEUA:384, META:388	No Interactions
5	Isoaromadendreneepoxide	-8.3	ARGA:434	LEUA:509, HISA:513, ILEA:510, PHEA:404, LEUA:384
6	Butanedioic acid diethyl ester	-5.6	GLUA:323, TRPA:393	LEUA:403, ARG:394, META:396, PROA:324, ILEA:326
7	9,12,15-octadecatrienoic acid	-7	HISA:524, GLYA:521	LEUA:346, PHEA:404, META:388, LEUA:391, LEUA:387, ALAA:350, LEUA:384, LEUA:525, TRPA:383
8	Beta-ionone	-7.2	THRA:347	ALAA:350, LEUA:387, PHEA:404, LEUA:391
9	9,12-octadecadienoic acid	-6.8	ARGA:394, LEUA:387	TRPA:383, ALAA:350, LEUA:384, LEUA:525, PHEA:404, ILEA:424, META:421, LEUA:391, META:388, LEUA:346
10	Alpha muurolol	-7.9	META:343, THRA:347, LEUA:349	ALAA:350, LEUA:387, PHEA:404, LEUA:525, LEUA:384, TRPA:383, LEUA:346, META:421
11	Bauhinione	-8.6	LEUA:387, ILEA:424, META:421, HISA:524	LEUA:346, ALAA:350, PHEA:404
12	Beta-sitosterol	-7	LEUA:354	VALA:376, ILEA:358, LEUA:372, TRPA:383
13	Kaempferol-3-glucoside	-8.4	ARGA:394, GLUA:353	ILEA:424, META:421, LEUA:387, ALAA:350, LEUA:391
14	TAMOXIFEN (STANDARD)	-6.2	ARGA:515	LEUA:508, LEUA:479, ILEA:451

Molecular docking interactions of the plant components were elucidated with 6VYO target, were various hydrogen bond interactions like ALAA:50, TYRA:111, ARG:88, TYRA:109, ALAA:55, ARG:107, ASN:153, VALA:158, ILEB:157, ILEB:146, THRB:76, ASN:77, ALAA:55, ARG:107, ASN:75, SERA:105, SERB:79, THRB:141, HISA:59, ASPB:81 were observed. Binding energies of all the compounds were found between -5.7 to -9.7 kcal/mol which were illustrated in (Table 7). Among all compounds, Isoaromadendreneepoxide showed more binding energy than the standard N3 inhibitor of 6LU7 (-5.8 kcal/mol).

Table 5. Calculated binding energy values and interaction properties of the plant constituents of *Bauhinia acuminata* the target 3L4U

S.No	Plant Constituent	Binding energy (kcal/mol)	Hydrogen Bond Interactions	Alkyl/ π Alkyl Interactions
1	Quercetin	-7.3	ASP:A:542	ASP:A:443, MET:A:444, PHE:A:575, TYR:A:299, TRP:A:406
2	Neophytadiene	-5.7	TYR:A:299	TRP:A:441, HIS:A:600, PHE:A:575, TRP:A:406, PHE:A:450
3	Rheagenine	-8.3	ASP:A:203	LYS:A:480, ASP:A:542, TRP:A:406
4	Alpha humulene	-6	No Interactions	PHE:A:575, ALA:A:576
5	Isoaromadendrene epoxide	-5.8	GLU:A:333	ARG:A:334
6	Butanedioic acid diethyl ester	-5.9	THR:A:205, ASP:A:203, THR:A:204	ILE:A:328, TRP:A:406, TYR:A:605, PHE:A:575, ALA:A:576, TYR:A:299
7	9,12,15-octadecatrienoic acid	-5.5	HIS:A:600	TYR:A:299, PHE:A:575, ALA:A:576, TYR:A:605, ASP:A:443
8	Beta-ionone	-5.3	GLN:A:603	TRP:A:406
9	9,12-octadecadienoic acid	-5.4	THR:A:205	LYS:A:480, TRP:A:406, PHE:A:575, PHE:A:450, ILE:A:328, TYR:A:299
10	Alpha muurolol	-5.4	ASP:A:203	PHE:A:450, LYS:A:480
11	Bauhinione	-6.4	LYS:A:480, PHE:A:450, GLU:A:404	No Interactions
12	Beta-sitosterol	-7.5	GLU:A:404	PHE:A:575, PHE:A:450
13	Kaempferol-3-glucoside	-7.1	ARG:A:526, ASP:A:542, ASP:A:443	TYR:A:299, PHE:A:575, TRP:A:406
14	ACARBOSE (STANDARD)	-7.1	No Interactions	TYR:A:301, GLU:A:333, ASP:A:340, GLU:A:300, ASP:A:329, GLY:A:302

All the plant components made hydrogen bond interactions with aminoacids PHE:A:10, ALA:A:63, ARG:A:18, PRO:A:61, SER:A:66, ARG:A:18, VAL:A:64, VAL:A:87, ALA:A:88, ARG:A:11, PRO:A:275, VAL:A:81, TYR:A:62, ASN:A:67, SER:A:91, PRO:A:84 in the active site of 1T02 target. Binding energies of all the compounds were found between -6.32 to -8.7 kcal/mol were illustrated in (Table 8). Among all compounds, Rheagenine, Beta-sitosterol, Bauhinione, Quercetin showed more binding energies than the Standard Simvastatin (-7.7 kcal/mol).

As a result of the docking process on 6 different targets, the selected plant components like Quercetin, Beta-sitosterol, and Rheagenine were observed to show better binding energy values against all the 5 targets except 6VYO as shown in (Table 9).

This present study has paved the way in understanding that some of the plant components of *Bauhinia acuminata* may act as potential inhibitors against enzyme targets namely 2ITY, 1A52, 3L4U, 1T02, 5-COX except 6VYO.

As a result of the docking process on 6 different targets, the selected plant components like Quercetin, Beta-sitosterol, and RHEAGENINE were observed to show good binding energy values against all the 5 targets except 6VYO. This research can further provide better insights in identifying and designing potential lead candidates against Lung cancer, breast cancer, diabetes, obesity, and inflammation in the area of drug discovery.

Table 6. Calculated binding energy values and interaction properties of the plant constituents of *Bauhinia acuminata* the target 1T02.

S.No	Plant Constituent	Binding energy (kcal/mol)	Hydrogen Bond Interactions	Alkyl/ π Alkyl Interactions
1	Quercetin	-7.8	ASNA:67, SERA:91, ALAA:88	VALA:87, ARG:11
2	Neophytadiene	-6.3	No Interactions	VALA:64, ALAA:63, ARG:18, LEUA:19, ILEA:22, LEUA:36, PHEA:10, PROA:15
3	Rheagenine	-8.7	SERA:66, ALAA:88, ARG:18	VALA:87, ALAA:63, PHEA:10, ARG:11
4	Alpha humulene	-7.1	LEUA:19, ARG:18	No Interactions
5	Isoaromadendrene epoxide	-7.3	PROA:275, VALA:81	VALA:278, TRPA:284
6	Butanedioic acid diethyl ester	-6.6	ARG:18, VALA:64	VALA:87, ALAA:88, ARG:11, LEUA:19, ILEA:22, ILEA:344, TYRA:62, LEUA:36, LEUA:19
7	9,12,15-octadecatrienoic acid	-6.7	SERA:66, SERA:91, VALA:64	VALA:87, PHEA:10, ALAA:63, PROA:15, ARG:18, LEUA:19, ILEA:22, LEUA:36, TYRA:62
8	Beta-ionone	-6.3	ARG:18	ILEA:22, VALA:64, LEUA:19
9	9,12-octadecadienoic acid	-6.4	SERA:66, SERA:91, VALA:87, ALAA:88, ARG:11	VALA:64, ALAA:63, ARG:18, LEUA:19, ILEA:22, LEUA:36, PHEA:10
10	Alpha muurolol	-7.6	TYRA:62	ILEA:344, VALA:64, LEUA:36, ILEA:22, LEUA:19, PROA:15, ARG:18
11	Bauhinione	-8	ASNA:67, SERA:66, SERA:91, ARG:11	ALAA:88
12	Beta-sitosterol	-8.3	PROA:84	PROA:61, ALAA:63, VALA:87, ARG:11
13	Kaempferol-3-glucoside	-7.6	No Interactions	LEUA:19, ILEA:22, VALA:87
14	SIMVASTATIN (STANDARD)	-7.7	PHEA:10, ALAA:63, ARG:18, PROA:61	VALA:87

Table 7. Calculated binding energy values and interaction properties of the plant constituents of *Bauhinia acuminata* the target 5COX

S.No	Plant Constituent	Binding energy (kcal/mol)	Hydrogen Bond Interactions	Alkyl/ π Alkyl Interactions
1	Quercetin	-8.4	TYRB:373, GLNB:374, ARG:376, ASNA:375, TYRA:373	PHEA:142
2	Neophytadiene	-5	LEUA:145	PHEB:142, LEUB:145, PHEA:142
3	Rheagenine	-9.9	ASNB:375, ASNA:375, ARGB:376, LEUB:145, LEUA:145	No Interactions
4	Alpha humulene	-6.5	PHEB:142	No Interactions
5	Isoaromadendrene epoxide	-7.1	PHEB:142, ARGB:376, LEUA:145	No Interactions
6	Butanedioic acid diethyl ester	-6.2	PROB:538	PHEA:142
7	9,12,15-octadecatrienoic acid	-5.2	HISB:226	LEUA:145, PHEA:142
8	Beta-ionone	-6.2	GLNA:241, TRPB:139, LYSA:333, GLUB:140	LEUA:238
9	9,12-octadecadienoic acid	-5.4	GLYA:227, ASNA:375	LEUA:145, PHEB:142, LEUB:145
10	Alpha muurolol	-6.7	GLYB:225, ASNB:375	HISB:226, LEUB:145, PHEA:142
11	Bauhinione	-8.1	ASNA:375, LEUA:145, GLYA:225	PROA:538, PHEB:142
12	Beta-sitosterol	-9.3	GLYA:536	PHEB:142
13	Kaempferol-3-glucoside	-8.1	ASNB:375, VALB:228	PROB:538
14	ASPRIN (STANDARD)	-5.8	LYSA:333, GLNA:241, GLUB:140, ASNB:144	No Interactions

Table 8. Calculated binding energy values and interaction properties of the plant constituents of *Bauhinia acuminata* the target 6VYO

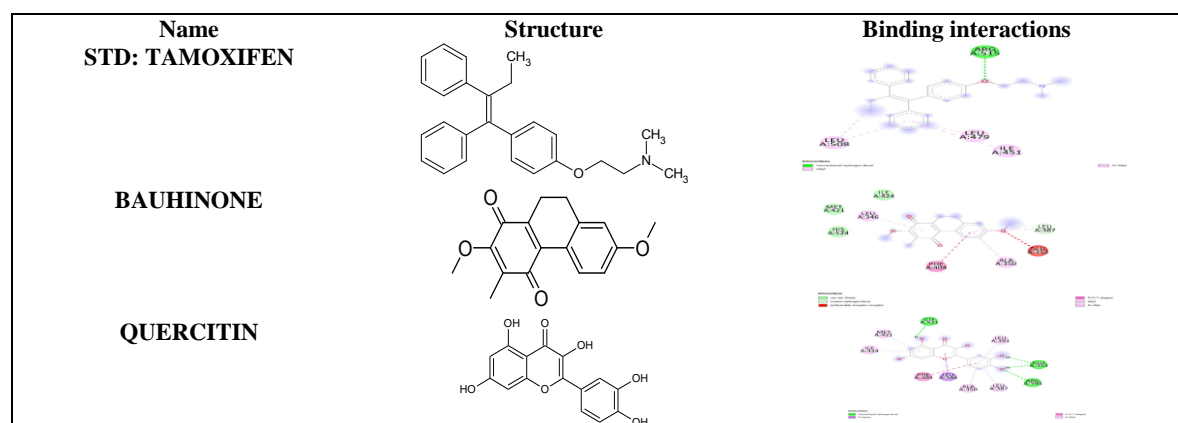
S.No	Plant Constituent	Binding energy (kcal/mol)	Hydrogen Bond Interactions	Alkyl/ π Alkyl Interactions
1	Quercetin	-8.1	ASNB:153	ARGA:107, TRPB:52, ALAA:55
2	Neophytadiene	-5.7	No Interactions	ILEB:74, ILEB:157, VALA:158, TRPB:52, CLA:202, ILEB:146
3	Rheagenine	-7.9	THRB:76, ASNB:77	ILEB:157, VALA:158
4	Alpha humulene	-8.7	No Interactions	No Interactions
5	Isoaromadendrene epoxide	-9.7	VALA:158, ILEB:157, ILEB:146	TRPB:52

Table 8 (continued). Calculated binding energy values and interaction properties of the plant constituents of *Bauhinia acuminata* the target 6VYO.

S.No	Plant Constituent	Binding energy (kcal/mol)	Hydrogen Bond Interactions	Alkyl/ π Alkyl Interactions
6	Butanedioic acid diethyl ester	-6.7	ALAA:55, ARG:107, ARG:149, ASNB:154, ASNB:153	ILEB:157, ALAA:50, TYRA:109, VALA:158, TRPB:52
7	9,12,15-octadecatrienoic acid	-6.4	ARG:92, ARG:107, THR:148	CLA:202, TRPB:52, ILEB:146
8	Beta-ionone	-7.8	ALAA:55, ARG:107	TRPB:52
9	9,12-octadecadienoic acid	-6.3	ALAB:155, ALAA:156, ASNB:154	ILEB:146, ILEB:157, CLA:202, ALAA:55, TYRA:109, TRPB:52
10	Alpha muurolol	-7.8	No Interactions	ILEB:157, VALA:158, TRPB:52, ALAA:55
11	Bauhinione	-6.9	SERA:105, SERB:79, THR:141, HISA:59, ASPB:81	HISB:145, ASPB:144, LYSA:102, PROB:142
12	Beta-sitosterol	-7.2	No Interactions	TYRA:172, PROB:80, PROB:162
13	Kaempferol-3-glucoside	-7.6	ALAA:55, ASNB:75	ILEB:146, TRPB:52, ARG:107
14	N3 INHIBITOR of 6LU7 (STANDARD)	-8.7	ALAA:50, TYRA:111, ARG:88, TYRA:109, ALAA:55, ARG:107, ASNB:153	PROA:117, TRPB:52

Table 9. Binding energy values of prioritized plant constituents of *Bauhinia acuminata* againsts elected targets

Target protein	2ITY	1A52	3L4U	IT02	5COX	6VYO
Plant constituent	Binding energy (kcal/mol)					
Quercetin	-8	-8.5	-7.3	-7.8	-8.4	-8.1
Beta sitosterol	-8.4	-7	-7.5	-8.3	-9.3	-7.2
Rheagenine	-9.2	-7.2	-8.3	-8.7	-9.9	-7.9
Standard	-7.1	-6.2	-7.1	-7.7	-5.8	-8.7

**Figure 1.** Docking interaction of Tamoxifen (Standard), Bauhinione and Quercetin within the active site of target 1A52

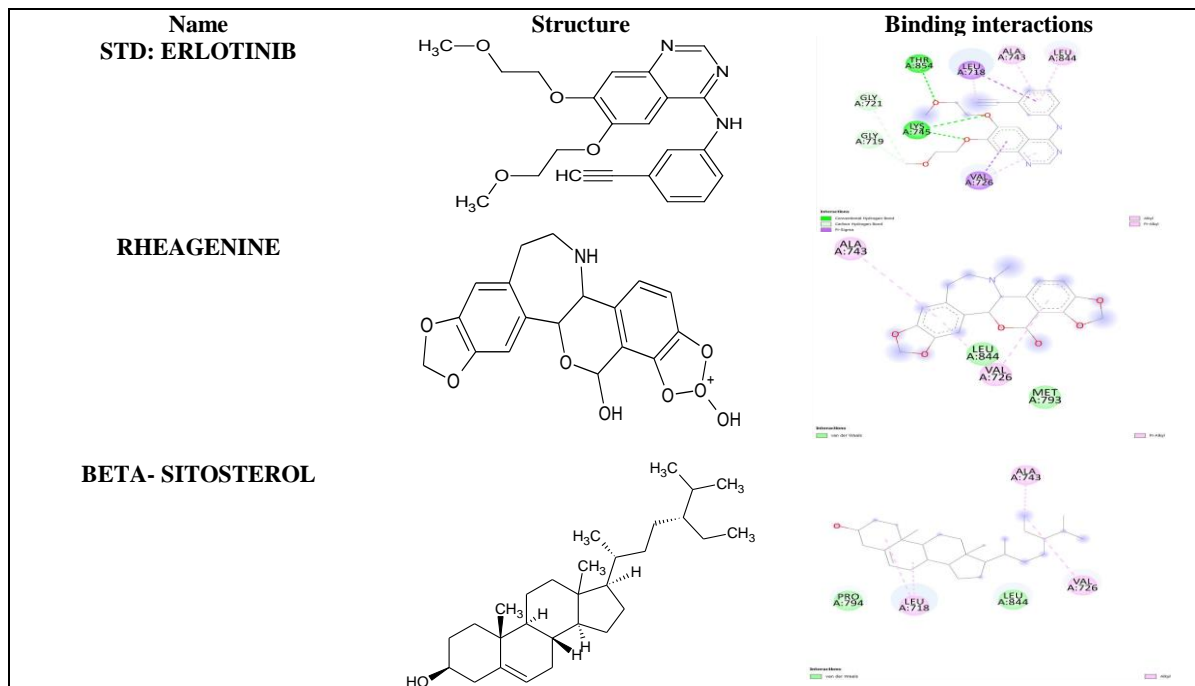


Figure 2. Docking interaction of Erlotinib (Standard), RHEAGENINE and Beta-sitosterol within the active site of target 2ITY

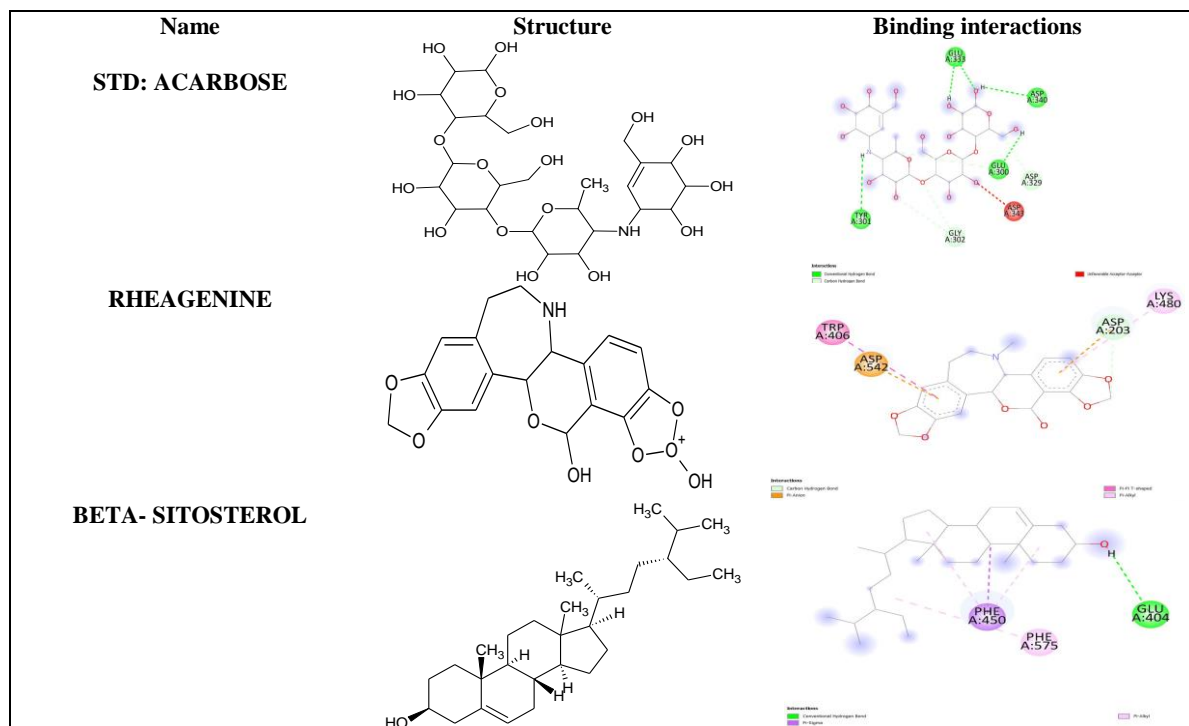


Figure 3. Docking interaction of Acarbose (Standard), RHEAGENINE and Beta-sitosterol within the active site of target 3L4U

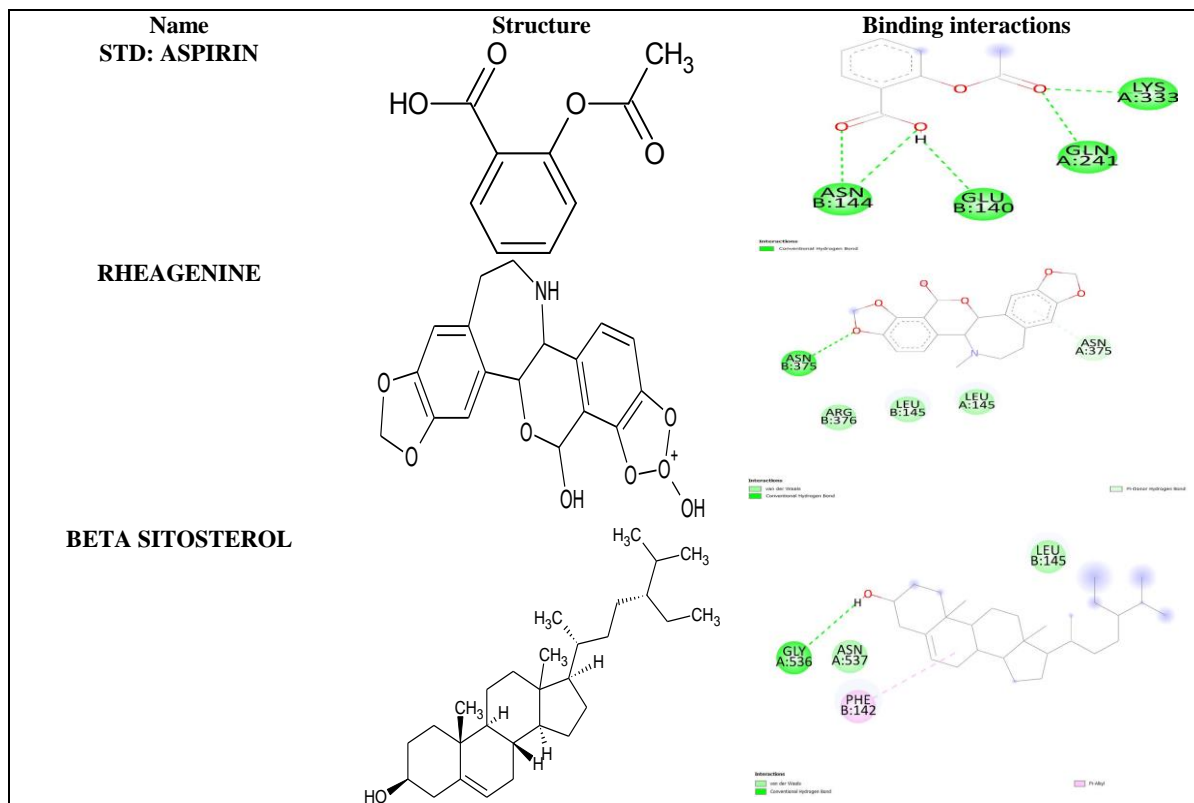


Figure 4. Docking interaction of Aspirin (Standard), RHEAGENINE and Beta-sitosterol within the active site of target 5COX

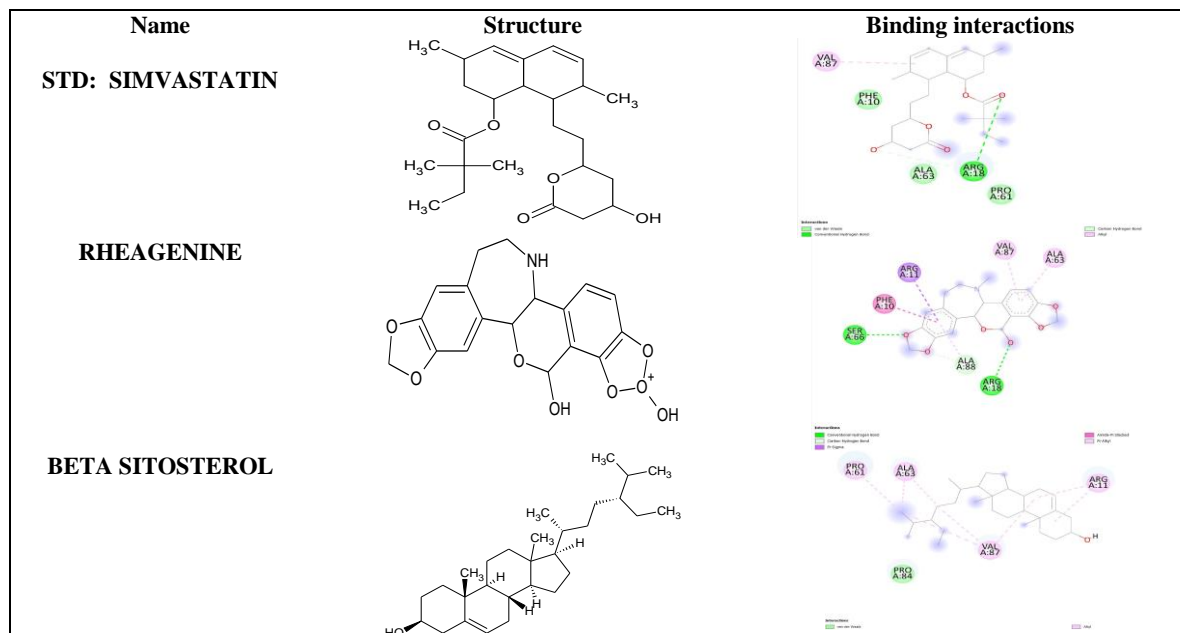


Figure 5. Docking interaction of Simvastatin (Standard), RHEAGENINE and Beta-sitosterol within the active site of target 1T02

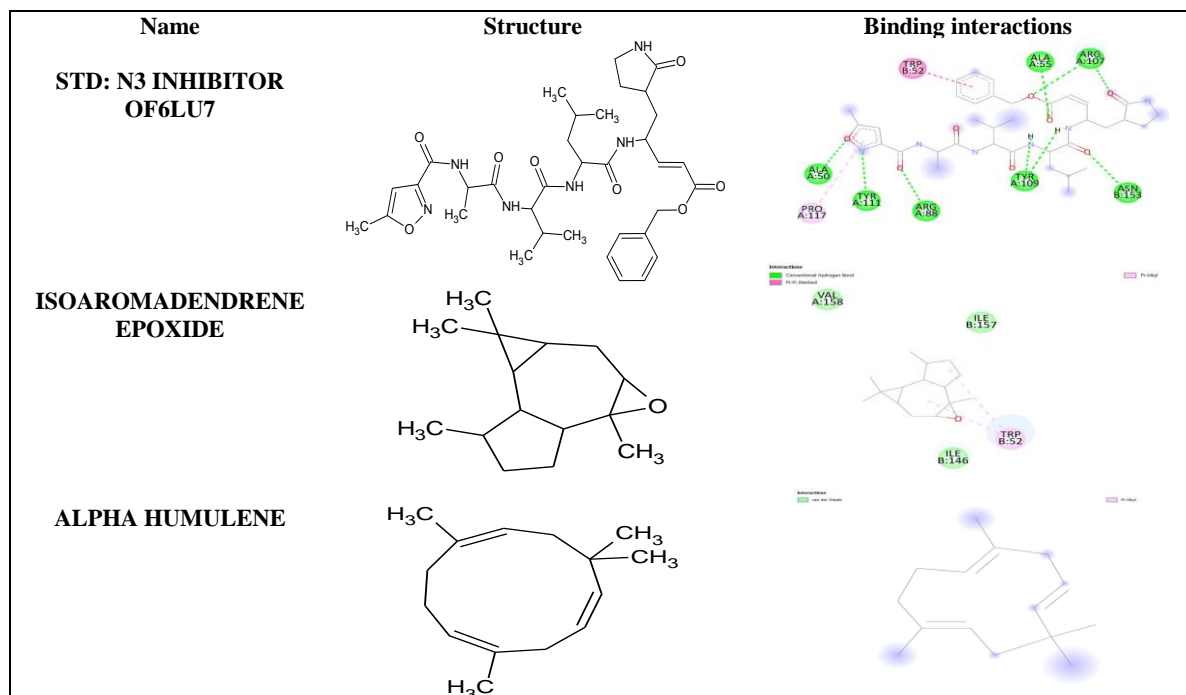


Figure 6. Docking interaction of N3 Inhibitor of 6LU7(Standard), Isoaromadendrene epoxide and Alpha Humulene within the active site of target 6VYO

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are thankful to the Principal and Management of Sarojini Naidu Vanita Pharmacy Maha Vidyalaya, Osmania University, Hyderabad, India, for providing research facilities.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: *N.K.*; Design: *V.K., M.S.*; Supervision: *N.K.*; Resources: *V.K., M.S.*; Materials: *M.S., V.K.*; Data Collection and/or processing: *N.K., V.K., M.S.*; Analysis and/or interpretation: *N.K., M.S.*; Literaturereview: *N.K.*; Manuscript writing: *N.K., V.K., M.S.*; Critical review: *N.K., V.K., M.S.*

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

The authors declare that the ethics committee approval is not required for this study.

REFERENCES

1. Qi, Z. (2013). WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. Geneva: World Health Organization.
2. Chintamunnee, V., Mahomoodally, M.F. (2012). Herbal medicine is commonly used against non-communicable diseases in the tropical island of Mauritius. *Journal of Herbal Medicine*, 2(4), 113-125. [\[CrossRef\]](#)
3. Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(1), 1-93. [\[CrossRef\]](#)
4. Lin, L.L., Shan, J.J., Xie, T., Xu, J.Y., Shen, C.S., Di, L.Q., Chen, J.B., Wang, S.C. (2016). Application of traditional Chinese medical herbs in prevention and treatment of the respiratory syncytial virus. *Evidence Based Complementary Alternative Medicine*, 2016, 6082729. [\[CrossRef\]](#)
5. Lin T.Z., Hsu W.C., Lin C.C (2014). Antiviral natural products and herbal medicines. *Journal of Traditional and Complement Medicine*, 4(1), 24-35. [\[CrossRef\]](#)
6. Sebastian, D., Nirmal, S. (2020). Pharmacognostic standardization and preliminary phytochemical studies of *Bauhinia acuminata*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(2), 2150-2154.
7. Sebastian, D., Fleming, A.T. (2017). Synthesis of silver nanoparticles from *bauhinia acuminata* aqueous leaf extract and molecular docking analysis of various cancer receptors. *International Journal of Science and Research*, 6(3), 50-55.
8. Roy, M.N., Naz, T., Khan, A., Ali, H. (2017). Antidiabetic potential of methanolic extract of leave and bark of bangladeshi medicinal plant *Bauhinia acuminata* L on mice. *Journal of Diabetes and Metabolism*, 8(9), 762. [\[CrossRef\]](#)
9. Govindula, A., Reddy, M.S., Manjula, M., Reddy, M.S., Kalyani, P. (2019). In vivo antihyperlipidemic activity and preliminary phytochemical screening of *Bauhinia acuminata*. *International Journal of Pharma Sciences and Scientific Research*, 11(2), 1000-1008.
10. Dutta, S., Hossain, S., Islam, E., Haque, U., Parvin, S. (2020). Assessment of antioxidant and anti-inflammatory activities of stem bark of *Bauhinia acuminata* L. *Bio medical Journal of Scientific and Technical Research*, 24(5), 18519-18527. [\[CrossRef\]](#)
11. Reddy, P.S., Lokhande, K.B., Nagar, S., Reddy, V.D., Murthy, P.S., Swamy, K.V. (2018). Molecular modeling, docking, dynamics and simulation of gefitinib and its derivatives with EGFR in non-small cell lung cancer. *Current Computer Aided Drug Design*, 14(3), 246-252. [\[CrossRef\]](#)
12. Tecalco-Cruz, A.C., Ramírez-Jarquín, J.O., Cruz-Ramos, E. (2019). Estrogen receptor alpha and its ubiquitination in breast cancer cells. *Current Drug Targets*, 20(6), 690-704.
13. Dirir, A.M., Daou, M., Yousef, A.F., Yousef, L.F. (2021). A review of alpha-glucosidase inhibitors from plants as potential candidates for the treatment of type-2 diabetes. *Phytochemistry Reviews*. [\[CrossRef\]](#)

14. März, W., Köenig, W. (2003). HMG CoA Reductase inhibition: anti-inflammatory effects beyond lipid lowering? *Journal of Cardiovascular Risk*, 10(3), 169-179. [\[CrossRef\]](#)
15. Kurumbail, R.G., Stevens, A.M., Gierse, J.K., McDonald, J.J., Stegeman, R.A., Pak, J.Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J.M., Penning, T.D., Seibert, K., Isakson, P.C., Stallings, W.C. (1996). Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 384(6610), 644-648. [\[CrossRef\]](#)
16. Ercan, S., Ercan, Ç. (2021). A molecular docking study of potential inhibitors and repurposed drugs against SARS-CoV-2 main protease enzyme. *Journal of the Indian Chemical Society*, 98(3), 100041. [\[CrossRef\]](#)
17. Protein Data Bank (PDB) [\[CrossRef\]](#)
18. AutoDockVina. v.1.2.0, the free GUI for AutoDock Vina. [\[CrossRef\]](#)
19. Pharmit: interactive exploration of chemical space. [\[CrossRef\]](#)
20. MuniSireesha, S., Bhowmik, D., Soujanya, D., Brijitha, G., AndJyothi, V. (2021). Computational validation of tacrine analogs as antialzheimer's agents against acetylcholinesterases. *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences*, 10(10), 243-254. [\[CrossRef\]](#)
21. Barnum, D., Greene, J., Smellie, A., Sprague, P. (1996). Identification of common functional configurations among molecules. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 36(3), 563-571. [\[CrossRef\]](#)
22. Kudumula, Divya, N., Sravika, N., Priya, S., Anusha, P., Jyotsna, M.S. (2021). Molecular properties, biological activity results, and toxicity predictions of the plant components present in *Bauhinia Acuminata*. *International Journal of Scientific Research and Management*, 9(7), 408-414. [\[CrossRef\]](#)



A STUDY ON PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *QUERCUS MACRANTHERA* SUBSP. *SYSPIRENSIS* (K. KOCH) MENITSKY BRANCH AND LEAF EXTRACTS

QUERCUS MACRANTHERA SUBSP. *SYSPIRENSIS* (K. KOCH) MENITSKY'İN DAL VE YAPRAK EKSTRELERİNİN FİTOKİMYASAL ANALİZİ VE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA

Merve Eylül KIYMACI ^{1*} , Kenan Can TOK ² , Muhammed Mesud HÜRKÜL ³ 

¹University of Health Sciences Turkey, Gülhane Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Ankara, Turkey

²Ankara University, Institute of Forensic Sciences, Department of Forensic Toxicology, Ankara, Turkey

³Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany, Ankara, Turkey

ABSTRACT

Objective: Oak species are medicinal plants with traditional use around the world. These species, which are very rich in tannins, have potential as antibacterial agents in terms of the polyphenolic compounds content. In this study, the antibacterial potential and phytochemical content of the branches and leaves of *Quercus macranthera* subsp. *syspirensis*, which is endemic to Turkey, were investigated.

Material and Method: Plant materials were collected from Araç (Kastamonu/Turkey) in 2020. Methanol extracts were prepared from dried and powdered branches and leaves. The antibacterial activity test was evaluated by broth microdilution method as a minimal inhibition concentration (MIC) against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633. The GC-MS analysis of extracts were performed using an Agilent 6890 gas chromatograph equipped with an Agilent 5973N quadrupole mass spectrometer (Agilent, USA). The compounds were identified by comparing the mass spectrum ratio of the sample with the data available in NIST 2014 Mass Spectral Library.

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Merve Eylül Kiyimaci
e-mail / e-posta: mekiymaci@gmail.com, **Phone / Tel.:** +90 312 304 6073

Result and Discussion: As a result, it was found that the branch extracts were more effective than the leaf extracts and both branch and leaf extracts showed the highest activity against *Bacillus subtilis* ATCC 6633 strain (48.8 µg/ml, 97.6 µg/ml, respectively). The extracts also showed antibacterial activity at varying concentrations on other test strains.

Keywords: Antibacterial, branch, GC-MS, leaf, *Quercus macranthera* subsp. *syspirensis*

ÖZ

Amaç: Meşe türleri dünya genelinde geleneksel kullanımı olan tıbbi bitkilerdendir. Tanen bakımından oldukça zengin olan bu türlerin içerdikleri polifenolik bileşikler açısından antibakteriyel ajan olarak potansiyelleri vardır. Bu çalışmada Türkiye için endemik olan *Quercus macranthera* subsp. *syspirensis*'in dal ve yapraklarının antibakteriyel potansiyeli ve fitokimyasal içeriği araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bitki materyalleri 2020 yılında Araç'tan (Kastamonu/Türkiye) toplanmıştır. Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş dal ve yapraklardan metanol ekstraktları hazırlanmıştır. Antibakteriyel aktivite, minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 ve *Bacillus subtilis* ATCC 6633 mikroorganizmaları üzerine test edilmiştir. Ekstrelerin GC-MS analizi, Agilent 5973N dört kutuplu kütle spektrometresi (Agilent, ABD) ile donatılmış bir Agilent 6890 gaz kromatografisi kullanılarak yapılmıştır. Bileşikler, numunenin kütle spektrum oranı NIST 2014 Kütle Spektral Kütüphanesinde bulunan verilerle karşılaştırılarak tanımlanmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Sonuç olarak, dal ekstraktlarının yaprak ekstraktlarından daha etkili olduğu bulundu ve her iki ekstrenin de en yüksek antibakteriyel aktiviteyi *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşuna karşı gösterdiği belirlendi. Ekstreler ayrıca diğer test suşları üzerinde değişen konsantrasyonlarda aktivite gösterdi.

Anahtar kelimeler: Antibakteriyel, GC-MS, dal, yaprak, *Quercus macranthera* subsp. *syspirensis*

INTRODUCTION

In the search for a solution to antimicrobial resistance that has emerged in recent years, active substances obtained from plants come to the fore. Although 25-50% of existing pharmaceuticals are obtained from herbal raw materials. Plants contain various secondary metabolites with antimicrobial activity such as tannins, terpenoids, alkaloids and flavonoids that are one of the go-to reservoirs to alleviate this problem [1].

The distribution areas of the genus *Quercus* L. are in the Northern Hemisphere and these plants, called oaks, have 461 accepted species worldwide [2, 3]. Oak species are rich in tannins, they are also known to contain gallic acid, caffeic acid, ferulic acid, ellagic acid, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, (+)-catechin and (+)-gallocatechin [4-10]. It is widely used as traditionally in the treatment of diabetes, wounds, respiratory diseases, diarrhea, obesity, fungus, ulcers, toothache, hemorrhoids, abscesses, dermatitis and burns [11-24]. It has been proven that the medically important *Quercus* species have antibacterial, anticancer, gastroprotective, antiviral, cardioprotective and hepatoprotective activities [25-34]. *Quercus macranthera* subsp. *syspirensis* (K. Koch) Menitsky is endemic to Turkey, also called "ispir meşesi", the plant is a small deciduous tree, the leaves are obovate with 6-10 primary veins and the stipules are filiform [35-36].

In this study, the antibacterial activity of the branch (BM) and leaf (LM) methanol extracts of *Q. macranthera* subsp. *sypirensis* were investigated and the phytochemical analysis of the extracts were carried out with Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS).

MATERIAL AND METHOD

Plant materials and preparation of extracts

Plant materials were collected from Araç (Kastamonu/Turkey) in 2020. A voucher specimen was deposited in the Ankara University Faculty of Pharmacy Herbarium (AEF). The collected plant parts (branches and leaves) were dried in the shade. The plant parts were extracted by using the maceration method with methanol.

Antibacterial activity

Antibacterial activity of the branch and leaf extracts of *Q. macranthera* subsp. *sypirensis* was tested against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Antibacterial activity test was evaluated by broth microdilution method as a minimal inhibition concentration (MIC) according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing standards [37].

GC/MS analysis

For GC-MS analysis of plant extracts, a two-step derivatization method including methoximation (methoxyamine derivatization) and silylation was used [38]. Methoxyamine reacts with the carbonyl groups of sugars to form oxime derivatives, thus preventing ring formation that causes multiple chromatographic peaks [39]. It also helps to protect α -keto acids from decarboxylation. Before the methoxyamine derivatization, methoxyamine hydrochloride (MeOX) (Germany, Sigma-Aldrich) solution freshly prepared in pyridine (25 mg/ml). 30 μ l MeOX solution added to the dried extracts and waited 90 min at 30 °C for oximation of sugars. In the second step of derivatization, silylation was performed using 30 μ l of BSTFA-1%TMCS (Germany, Sigma-Aldrich).

The analysis was performed using an Agilent 6890 gas chromatograph equipped with an Agilent 5973N quadrupole mass spectrometer detector (Santa Clara, USA). All samples were analyzed using the RTX-5MS Low-Bleed fused silica gas chromatography capillary column (30m \times 0.25mm i.d. \times 0.25 μ m film thickness) (Restek, USA). Ultrapure helium was preferred as the carrier gas and a constant flow rate of 1.5 ml/min was used. The injection port was maintained at 280 °C. The ion source, quadrupole and transfer line temperatures were adjusted at 230 °C, 150 °C and 280 °C, respectively. The GC oven program was held at 50 °C for 2 min, and then increased to 280 °C at 4 °C/min and held

for 10 min. Total analysis time was 70 min. The mass range was 40–550 m/z and the scan rate was 0.45 scan per second in full scan mode. Electron ionization was carried out using 70 eV ionization energy. Compounds were identified using MS Search software and the NIST 2014 Mass Spectral Library.

RESULT AND DISCUSSION

The MIC results of tested extracts were shown in Table 1. It was determined that the branch extracts (BM) were more effective than the leaf extracts (LM) and both extracts showed the highest antibacterial activity against *Bacillus subtilis* ATCC 6633 strain. The extracts also showed activity at varying concentrations on other test strains.

Table 1. Antibacterial activity results for tested extracts as MIC.

Extracts	Minimal inhibition concentrations (µg/ml)							
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633
BM	781.25	1562.5	6250	3125	1562	781.25	781.25	48.8
LM	3125	1562.5	6250	6250	6250	781.25	781.25	97.6

MIC results of *E. coli* for ciprofloxacin was found 0.078 µg/ml.

Since *Q. macranthera* subsp. *sympirensis* is an endemic plant, there is no literature data other than a study conducted in 2007 reported [40] that *Q. macranthera* subsp. *sympirensis* extracts prepared with different solvents (petroleum ether, ethyl acetate, *n*-butanol fractions and lyophilized water phase of methanol extract) showed the antibacterial activity at different concentrations (512–≥1024 µl) against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Therefore, the current study is important in terms of bringing data to the literature. Previous studies have shown that different *Quercus* species have antibacterial activity against various Gram positive and Gram negative bacteria. Ahmed et al. (2021) [41] determined that *Quercus floribunda* Lindl. ex A. Camus acorn extract showed antibacterial activity against *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* and *S. aureus*. Aleebrahim-Dehkordy et al. (2019) [42] showed that *Quercus brantii* Lindl. acorn ethanol (70%) extracts had inhibitory activity against *S. aureus* and *E. faecalis*. In the study of Elansary et al. (2019) [43], the antibacterial activities of the bark methanolic extracts of three *Quercus* species (*Q. robur*, *Q. macrocarpa* and *Q. acutissima*) exhibited antibacterial activities against most species of microorganism studied. The highest antibacterial activities were found against *S. aureus* ATCC 6538 (MIC 0.23 mg/ml), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (MIC 0.05 mg/ml), *Bacillus cereus* ATCC 14579 (MIC 0.11 mg/ml), *Listeria monocytogenes* (clinical isolate) (MIC 0.25 mg/ml), *E. coli* ATCC 35210 (MIC 0.10 mg/ml) for the extracts of *Q. robur*, compared to streptomycin. The methanol extracts of *Quercus alba* L. barks were tested for growth inhibition of *S. aureus* (IC₅₀ 64 µg/ml), *K. pneumoniae* (IC₅₀ 32 µg/ml), and *A. baumannii* (IC₅₀ 32 µg/ml), and evaluated for biofilm

inhibition (IC_{50} 1 $\mu\text{g/ml}$) against *S. aureus* by Dettweiler et al. (2019) [44]. Sánchez-Burgosa et al. (2013) [45] investigated the antibacterial activity of leaf aqueous extracts of *Q. resinosa* against *E. coli* ATCC 35218 (MIC 1.895 mg/ml), *S. epidermidis* ATCC 12228 (MIC 0.348 mg/ml), *K. pneumoniae* ATCC 13883 (MIC 0.547 mg/ml), *P. mirabilis* ATCC 12453 (MIC 0.708 mg/ml) and *P. vulgaris* ATCC 49132 (MIC 0.265 mg/ml).

Figure 1 and Figure 2 show the major compounds identified in branch and leaf extract by GC-MS. The analyzes show the presence of 17 and 19 compounds (Table 2-3), respectively in branch and leaf samples. *Q. macranthera* subsp. *sympirensis* branch extract contains 1,49% Carbonitrile, 1,50% Flavanoid, 1,63% Terpenoid, 2,28% Acid, 2,3% Carboxylic Acid, 2,58% Sugar Alcohol, 2,95% Steroids, 5,9% Cylopentapyrazoles, 5,94% Sulfonamide, 22,95% Phenols, 50,48% Sugars. However, *Q. macranthera* subsp. *sympirensis* leaf contains 0,59% Carbonitrile, 1,45% Steroids, 2,07% Sulfonamide, 2,32% Cylopentapyrazoles, 2,58% Sugar Alcohol, 5,41% Acids, 23,95% Phenols, 24,81% Carboxylic Acids, 36,82% Sugars.

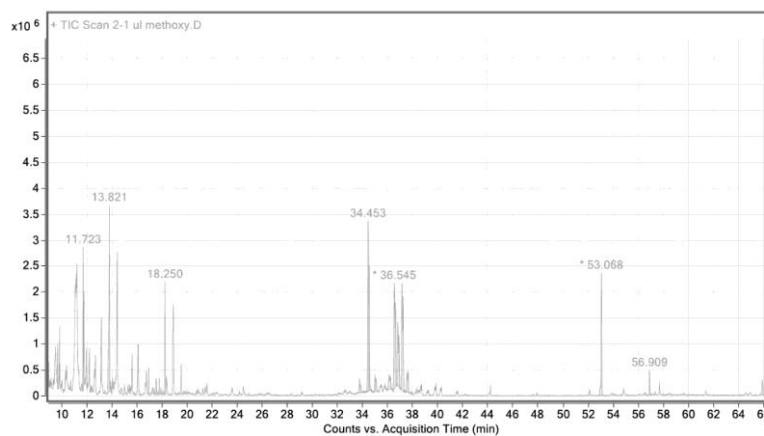


Figure 1. Compounds identified by GC-MS in *Q. macranthera* subsp. *sympirensis* branch extract.

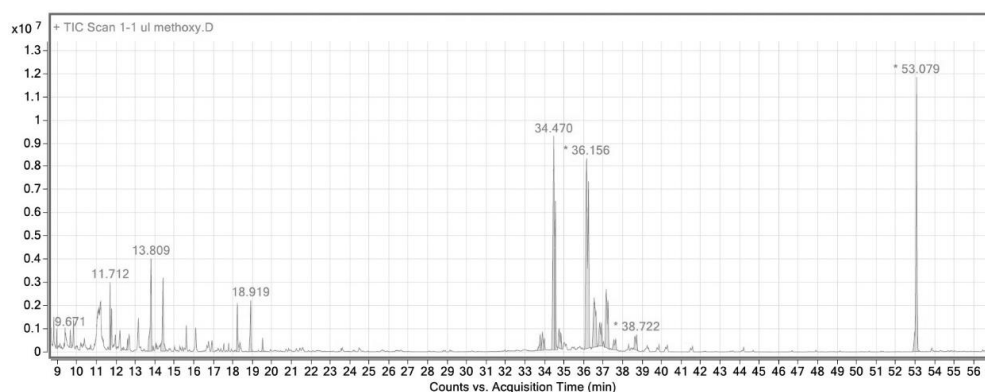


Figure 2. Compounds identified by GC-MS in *Q. macranthera* subsp. *sympirensis* leaf extract.

Table 2. Compounds identified by GC-MS in *Q. macranthera* subsp. *sypirensis* branch extract.

#	RT (min)	Identified compounds	%	Classification
1	9.671	<i>Boric acid</i>	2.28	Acid
2	11.712	<i>N-(2-Hydroxy-1-phenylethyl)-benzenesulfonamide</i>	5.95	Sulfonamide
3	18.233	<i>Benzo[c][1,2,5]-thiadiazole, 4,5,6,7-tetramethyl-</i>	5.90	Cylopentapyrazoles
4	18.919	<i>Glycerol</i>	2.58	Sugar alcohol
5	19.536	<i>3-Amino-2,6,6,7-tetramethyl-1-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydro-[2,7]naphthyridine-4-carbonitrile</i>	1.49	Cabonitrile
6	33.778	<i>Androst-5,7-dien-3-ol-17-one, acetate</i>	1.37	Steroid
7	34.453	<i>Myo-Inositol</i>	15.6	Phenol
8	34.550	<i>Scyllo-Inositol</i>	7.35	Phenol
9	35.002	<i>Androst-5-en-3-ol-17-one, 16, 16-trimethylenedithio-</i>	1.58	Steroid
10	36.156	<i>Quinic acid</i>	2.30	Carboxylic acid
11	36.545	<i>D-(-)-Fructose</i>	14.1	Sugar
12	36.825	<i>D-(-)-Fructose</i>	8.64	Sugar
13	37.162	<i>D-(+)-Talose</i>	15.4	Sugar
14	37.648	<i>D-Allose</i>	3.02	Sugar
15	53.079	<i>Sucrose</i>	9.32	Sugar
16	56.908	<i>Catechine</i>	1.50	Flavanoid
17	65.904	<i>Lupeol</i>	1.63	Terpenoid

Table 3. Compounds identified by GC-MS in *Q. macranthera* subsp. *sypirensis* leaf extract.

#	RT (min)	Identified compounds	%	Classification
1	9.671	<i>Boric acid</i>	0.76	Acid
2	11.712	<i>N-(2-Hydroxy-1-phenylethyl)-benzenesulfonamide</i>	2.07	Sulfonamide
3	12.603	<i>Methylphosphonic acid</i>	0.45	Acid
4	14.421	<i>Benzohydroxamic acid</i>	4.20	Acid
5	18.233	<i>Benzo[c][1,2,5]-thiadiazole, 4,5,6,7-tetramethyl-</i>	2.32	Cylopentapyrazoles
6	18.919	<i>Glycerol</i>	2.58	Sugar alcohol
7	19.536	<i>3-Amino-2,6,6,7-tetramethyl-1-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydro-[2,7]naphthyridine-4-carbonitrile</i>	0.59	Cabonitrile
8	33.778	<i>β-D-Glucopyranosiduronic acid</i>	1.13	Sugar
9	33.887	<i>Pregnane-3,17,20,21-tetrol, (3α,5β,17α,20α)-</i>	1.45	Steroid
10	34.470	<i>Myo-Inositol</i>	16.3	Phenol
11	34.550	<i>Scyllo-Inositol</i>	7.65	Phenol
12	34.750	<i>Shikimic acid</i>	2.01	Carboxylic acid
13	36.156	<i>Quinic acid</i>	22.8	Carboxylic acid
14	36.545	<i>D-(-)-Fructose</i>	6.51	Sugar
15	36.825	<i>D-(-)-Fructose</i>	2.73	Sugar
16	37.162	<i>D-(+)-Talose</i>	6.50	Sugar
17	37.648	<i>D-Allose</i>	1.22	Sugar
18	38.722	<i>D-Allofuranose</i>	1.63	Sugar
19	53.079	<i>Sucrose</i>	17.1	Sugar

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception: *M.E.K., K.C.T., M.M.H.*; Design: *M.E.K., K.C.T., M.M.H.*; Supervision: *M.E.K., K.C.T., M.M.H.*; Resources: *M.E.K., K.C.T., M.M.H.*; Materials: *M.E.K., K.C.T., M.M.H.*; Data collection and/or processing: *M.E.K., K.C.T., M.M.H.*; Analysis and/or interpretation: *M.E.K., K.C.T., M.M.H.*; Literature search: *M.E.K., K.C.T., M.M.H.*; Writing manuscript: *M.E.K.*; Critical review: *M.E.K., K.C.T., M.M.H.*; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

The authors declare that the ethics committee approval is not required for this study.

REFERENCES

1. Mahizan, N. A., Yang, S. K., Moo, C. L., Song, A. A., Chong, C. M., Chong, C. W., Abushelaibi, A., Lim, S. E., Lai, K. S. (2019). Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens. *Molecules*, 24(14), 2631. [CrossRef]
2. Morales, D. (2021). Oak trees (*Quercus* spp.) as a source of extracts with biological activities: A narrative review. *Trends in Food Science & Technology*, 109, 116-125. [CrossRef]
3. POWO. (2021). Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. <http://www.plantsoftheworldonline.org> Accessed: 21.11.2021.
4. Buche, G., Colas, C., Fougère, L., Giordanengo, T., Destandau, E. (2020). Untargeted UHPLC-Q-TOF- HRMS based determination of discriminating compounds for oak species *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* Liebl. identification. *Phytochemical Analysis*, 32(5), 660-671. [CrossRef]
5. Evans, W. (2002). Trease and Evans pharmacognosy (15th ed.). WB Saunders.
6. Marinov, M. G., Dimitrova, E. D., Puech, J. L. (1997). Kinetics of ellagitannin extraction from oak wood using white wine. *Journal of Wine Research*, 8(1), 29-40. [CrossRef]
7. Perez, A. J., Pecio, Ł., Kowalczyk, M., Kontek, R., Gajek, G., Stopinsek, L., Mirt, I., Oleszek, W., Stochmal, A. (2017). Triterpenoid components from oak heartwood (*Quercus robur*) and their potential health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(23), 4611-4623. [CrossRef]
8. Ricci, A., Parpinello, G. P., Palma, A. S., Teslić, N., Brilli, C., Pizzi, A., Versari, A. (2017). Analytical profiling of food-grade extracts from grape (*Vitis vinifera* sp.) seeds and skins, green tea (*Camellia sinensis*) leaves and Limousin oak (*Quercus robur*) heartwood using MALDI-TOF-MS, ICP-MS and spectrophotometric methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 59, 95-104. [CrossRef]
9. Şöhretoğlu, D., Sakar, M. K. (2004). Polyphenolic constituents and biological activities of *Quercus* species. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 33(3), 183-215. [CrossRef]
10. Vivas, N., Nonier, M. F., de Gaulejac, N. V., de Boissel, I. P. (2004). Occurrence and partial characterization of polymeric ellagitannins in *Quercus petraea* Liebl. and *Q. robur* L. wood. *Comptes Rendus Chimie*, 7(8-9), 945-954. [CrossRef]

11. Bulut, G., Haznedaroğlu, M. Z., Doğan, A., Koyu, H., Tuzlacı, E. (2017). An ethnobotanical study of medicinal plants in Acipayam (Denizli-Turkey). *Journal of Herbal Medicine*, 10, 64-81. [\[CrossRef\]](#)
12. Cakilcioglu, U., Turkoglu, I. (2010). An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazığ-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1), 165-175. [\[CrossRef\]](#)
13. Senkardes, I., Tuzlaci, E. (2014). Some Ethnobotanical Notes from Gundogmus District (Antalya/Turkey). *Clinical and Experimental Health Sciences*, 4(2), 63.
14. Sargin, S. A. (2021). Plants used against obesity in Turkish folk medicine: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113841. [\[CrossRef\]](#)
15. Sargin, S. A., Akçicek, E., Selvi, S. (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants used by the local people of Alaşehir (Manisa) in Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3), 860-874. [\[CrossRef\]](#)
16. Sargin, S. A., Selvi, S., Büyükcengiz, M. (2015). Ethnomedicinal plants of Aydıncık district of Mersin, Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 174, 200-216. [\[CrossRef\]](#)
17. Polat, R., Cakilcioglu, U., Satıl, F. (2013). Traditional uses of medicinal plants in Solhan (Bingöl-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 148(3), 951-963. [\[CrossRef\]](#)
18. Kültür, Ş. (2007). Medicinal plants used in Kırklareli province (Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 111(2), 341-364. [\[CrossRef\]](#)
19. Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., Tanaka, T. (2001). Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in central Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 75(2-3), 95-115. [\[CrossRef\]](#)
20. Carrió, E., Vallès, J. (2012). Ethnobotany of medicinal plants used in eastern Mallorca (Balearic Islands, Mediterranean Sea). *Journal of Ethnopharmacology*, 141(3), 1021-1040. [\[CrossRef\]](#)
21. Gilca, M., Tiplica, G. S., Salavastru, C. M. (2018). Traditional and ethnobotanical dermatology practices in Romania and other Eastern European countries. *Clinics in Dermatology*, 36(3), 338-352. [\[CrossRef\]](#)
22. Leporatti, M. L., Ivancheva, S. (2003). Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 87(2-3), 123-142. [\[CrossRef\]](#)
23. Sõukand, R., Pieroni, A. (2016). The importance of a border: medical, veterinary, and wild food ethnobotany of the Hutsuls living on the Romanian and Ukrainian sides of Bukovina. *Journal of Ethnopharmacology*, 185, 17-40. [\[CrossRef\]](#)
24. Šarić-Kundalić, B., Dobeš, C., Klatte-Asselmeyer, V., Saukel, J. (2010). Ethnobotanical study on medicinal use of wild and cultivated plants in middle, south and west Bosnia and Herzegovina. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(1), 33-55. [\[CrossRef\]](#)

25. Alkofahi, A., Atta, A. H. (1999). Pharmacological screening of the anti-ulcerogenic effects of some Jordanian medicinal plants in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 67(3), 341-345. [\[CrossRef\]](#)
26. Andrenšek, S., Simonovska, B., Vovk, I., Fyhrquist, P., Vuorela, H., Vuorela, P. (2004). Antimicrobial and antioxidative enrichment of oak (*Quercus robur*) bark by rotation planar extraction using ExtraChrom®. *International Journal of Food Microbiology*, 92(2), 181-187. [\[CrossRef\]](#)
27. Berahou, A., Auhmani, A., Fdil, N., Benharref, A., Jana, M., Gadhi, C. A. (2007). Antibacterial activity of *Quercus ilex* bark's extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(3), 426-429. [\[CrossRef\]](#)
28. Deryabin, D. G., Tolmacheva, A. A. (2015). Antibacterial and anti-quorum sensing molecular composition derived from *Quercus cortex* (Oak bark) extract. *Molecules*, 20(9), 17093-17108. [\[CrossRef\]](#)
29. Frédérick, M., Marcowycz, A., Cieckiewicz, E., Mégalizzi, V., Angenot, L., Kiss, R. (2009). *In vitro* anticancer potential of tree extracts from the Walloon Region forest. *Planta medica*, 75(15), 1634-1637. [\[CrossRef\]](#)
30. Gharzouli, K., Khennouf, S., Amira, S., Gharzouli, A. (1999). Effects of aqueous extracts from *Quercus ilex* L. root bark, *Punica granatum* L. fruit peel and *Artemisia herba-alba* Asso leaves on ethanol-induced gastric damage in rats. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 13(1), 42-45. [\[CrossRef\]](#)
31. Güllüce, M., Adıgüzel, A., Ögütçü, H., Şengül, M., Karaman, I., Şahin, F. (2004). Antimicrobial effects of *Quercus ilex* L. extract. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(3), 208-211. [\[CrossRef\]](#)
32. Jassim, S. A. A., Naji, M. A. (2003). Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 412-427. [\[CrossRef\]](#)
33. Khennouf, S., Benabdallah, H., Gharzouli, K., Amira, S., Ito, H., Kim, T. H., Yoshida, T., Gharzouli, A. (2003). Effect of tannins from *Quercus suber* and *Quercus coccifera* leaves on ethanol-induced gastric lesions in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1469-1473. [\[CrossRef\]](#)
34. Panchal, S. K., Brown, L. (2013). Cardioprotective and hepatoprotective effects of ellagitannins from European oak bark (*Quercus petraea* L.) extract in rats. *European Journal of Nutrition*, 52(1), 397-408. [\[CrossRef\]](#)
35. Davis, P. H. (1982). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh, UK: Edinburgh University Press.
36. Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M. T. (2012). *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*. Nezahat Gökyigit Botanik Bahçesi Yayınları, Flora Dizisi I.

37. EUCAST. (2021). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0_Breakpoint_Tables.pdf Accessed: 19.11.2021.
38. Villas- Bôas, S. G., Mas, S., Åkesson, M., Smedsgaard, J., Nielsen, J. (2005). Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass spectrometry reviews*, 24, 613-646. [CrossRef]
39. Blau, K., Halket, J. M. (1993). Handbook of derivatives for chromatography. Wiley.
40. Şöhretoğlu, D., Ekizoglu, M., Kiliç, E., Sakar, M. K. (2007). Antibacterial and antifungal activities of some *Quercus* species growing in Turkey. *FABAD Journal of Pharmaceutical sciences*, 32(3), 127.
41. Ahmed, M., Adil, M., Haq, I., Tipu, M. K., Qasim, M., Gul, B. (2021). RP-HPLC-based phytochemical analysis and diverse pharmacological evaluation of *Quercus floribunda* Lindl. ex A. camus nuts extracts. *Natural Product Research*, 35(13), 2257-2262. [CrossRef]
42. Alebrahim-Dehkordy, E., Rafieian-kopaei, M., Amini-Khoei, H., Abbasi, S. (2019). *In vitro* evaluation of antioxidant activity and antibacterial effects and measurement of total phenolic and flavonoid contents of *Quercus brantii* L. fruit extract. *Journal of Dietary Supplements*, 16(4), 408-416. [CrossRef]
43. Elansary, H. O., Szopa, A., Kubica, P., Ekiert, H., Mattar, M. A., Al-Yafrasi, M. A., El-Ansary, D. O., Zin Elabadin, T. K., Yessoufou, K. (2019). Polyphenol profile and pharmaceutical potential of *Quercus* spp. bark extracts. *Plants*, 8(11), 486. [CrossRef]
44. Dettweiler, M., Lyles, J., Nelson, K., Dale, B., Reddinger, R., Zurawski, D., Quave, C. L. (2019). American civil war plant medicines inhibit growth, biofilm formation, and quorum sensing by multidrug-resistant bacteria. *Scientific Reports*, 9, 7692. [CrossRef]
45. Sánchez-Burgos, J. A., Ramírez-Mares, M. V., Larrosa, M. M., Gallegos-Infante, J. A., González-Laredo, R. F., Medina-Torres, L., Rocha-Guzmán, N. E. (2013). Antioxidant, antimicrobial, antitopoisomerase and gastroprotective effect of herbal infusions from four *Quercus* species. *Industrial Crops and Products*, 42, 57-62. [CrossRef]



TOTAL PHENOLIC CONTENT AND *IN VITRO* ANALYSIS OF ANTIOXIDANT, ANTIBACTERIAL, AND ALPHA-GLUCOSIDASE INHIBITION PROPERTIES OF *CHROOCOCCUS MINUTUS* (KÜTZING) NÄGELI (CHROOCOCCALES, CYANOBACTERIA)

CHROOCOCCUS MINUTUS (KÜTZING) NÄGELİ'NİN (CHROOCOCCALES, CYANOBACTERIA) ANTİOKSİDAN, ANTİBAKTERİYEL VE ALFA-GLUKOZİDAZ İNHİBİSYON ÖZELLİKLERİNİN TOPLAM FENOLİK İÇERİĞİ VE İN VİTRO ANALİZİ

Eldrin DLR. ARGUELLES^{1*} 

¹University of the Philippine Los Baños, Philippine National Collection of Microorganisms (PNCM), National Institute of Molecular Biology and Biotechnology (BIOTECH), 4031, Laguna, Philippines

ABSTRACT

Objective: Cyanobacteria are novel sources of bioactive substances with important biological activities. In this study, the total phenolic content (TPC) and bioactive (antioxidant, antidiabetic, and antibacterial) properties of a freshwater cyanobacteria, *Chroococcus minutus* were investigated.

Material and Method: Methanol extract of *C. minutus* were prepared and subjected to different biological assays to determine the TPC, antioxidant, and alpha-glucosidase inhibition properties. The antibacterial activity was done using microtiter plate dilution assay against various medically important bacterial pathogens.

Result and Discussion: *C. minutus* has a TPC of 11.27 ± 0.14 mg GAE/g. Antioxidant efficiency of *C. minutus* are characterized by having potent DPPH scavenging activity with IC_{50} value of 255 μ g/ml. Assessment of alpha-glucosidase inhibition property showed that *C. minutus* extract have potent inhibition activity with IC_{50} of 5.50 μ g/ml as compared to acarbose (standard antidiabetic drug). In addition, *C. minutus* extract exhibited potent antibacterial activities against *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The current investigation shows the potential of *C. minutus* as source of active metabolites with important use in pharmaceutical applications.

Keywords: Biological activity, cyanobacteria, freshwater, Philippines

ÖZ

* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Eldrin DLR. Arguelles
e-mail / e-posta: edarguelles@up.edu.ph, Phone / Tel.: +63495362721

Amaç: Siyanobakteriler, önemli biyolojik aktivitelere sahip yeni biyoaktif madde kaynaklarıdır. Bu çalışmada, bir tatlı su siyanobakterisi olan *Chroococcus minutus*'un toplam fenolik içeriği (TPC) ve biyoaktif (antioksidan, antidiyabetik ve antibakteriyel) özellikleri incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: *C. minutus*'un metanol özütü hazırlanarak, TPC, antioksidan ve alfa-glukozidaz inhibisyon özelliklerini belirlemek için farklı biyolojik deneylere tabi tutulmuştur. Antibakteriyel aktivite, tıbbi açıdan önemli çeşitli bakteriyel patojenlere karşı mikrotitre plaka seyreltme deneyi kullanılarak yapılmıştır.

Sonuç ve Tartışma: *C. minutus*'un TPC'si 11.27 ± 0.14 mg GAE/g'dir. *C. minutus*'un antioksidan etkinliği, $255 \mu\text{g/ml}$ IC_{50} değeri ile güçlü DPPH temizleme aktivitesine sahip olmasıyla karakterize edilir. Alfa-glukozidaz inhibisyon özelliğinin değerlendirilmesi, *C. minutus* özütünün, akarboza (standart antidiyabetik ilaç) kıyasla $5.50 \mu\text{g/ml}$ IC_{50} ile güçlü inhibisyon aktivitesine sahip olduğunu gösterdi. Ek olarak, *C. minutus* özütü, *Bacillus cereus*'a, *Listeria monocytogenes*'e ve Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'a karşı güçlü antibakteriyel aktiviteler sergilemiştir. Mevcut araştırma, farmasötik uygulamalarda önemli kullanımı olan aktif metabolitlerin kaynağı olarak *C. minutus*'un potansiyelini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Biyolojik aktivite, siyanobakteriler, tatlı su, Filipinler

INTRODUCTION

Cyanobacteria have notable attractiveness as novel sources of bioactive substances with diverse biological activities (antioxidant, antimicrobial, antidiabetic, anti-inflammatory, and antiviral effects) [1,2]. Several strains of cyanobacteria (*Oscillatoria limnosa*, *Anabaena*, and *Synechocystis aquatilis*) were reported to show antibacterial activities against *Bacillus subtilis*, *B. thuringensis*, *B. megaterium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida tropicalis* [1,3]. These reported activities are associated with various intracellular and extracellular metabolites that are produced by several strains of cyanobacteria with known diverse biological activities [3]. Even though the chemical composition of the bioactive metabolites in cyanobacterial extract vary, the mechanism of action of these metabolites are usually similar, namely via photosystem II mediated electron flow inactivation of other organisms such as algae and bacteria. These allelopathic metabolites may serve an important role in species dominance and succession in nature [4]. One popular example of this substance is cyanobacterin which was isolated in *Scytonema hofmanni* and are reported to be toxic to cyanobacteria and a variety of eukaryotic algae.

Several species of cyanobacteria produce diverse kinds of secondary metabolites with antioxidants and antidiabetic properties. Previous studies show the isolation of several bioactive compounds from various cyanobacterial species such as flavonoids, protocatechuic acid, phycobiliproteins, gallic acids, chlorogenic acids, and catechin. These compounds are considered to have potent antioxidant and antidiabetic properties that can be tapped as novel alternative source of active substances for drug synthesis [1,5,6]. Cyanobacteria are considered reliable source of novel natural bioactive metabolites, since these organisms can be mass propagated in small and big bioreactors for large scale production. In addition, the growth characteristic of the cyanobacterial cells can be manipulated and controlled, so that no toxic substances will be included in the harvested algal biomass [1,6].

Cyanobacteria with high growth rate and novel bioactive metabolites have yet to be studied and exploited for pharmaceutical purposes, and isolation and characterization of algal strains with potential for pharmaceutical application remain the focus of continuing research [1,3,5]. Given these promising benefits which can be obtained from cyanobacteria, it is necessary to explore the potential of local species to produce bioactive compounds. Thus, the current study was conducted to determine total phenolic content and evaluate the antioxidant, antibacterial, and antidiabetic (using α -glucosidase inhibition assay) properties of a freshwater cyanobacteria, *Chroococcus minutus*.

MATERIAL AND METHOD

Chemicals

The chemicals used were of analytical grade and obtained from Sigma-Aldrich (Singapore City, Singapore). On the other hand, the solvents used were of analytical and HPLC grade and were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany, and Singapore City, Singapore) or Merck (Darmstadt, Germany).

Cyanobacterial Culture and Cultivation

The cyanobacteria, *C. minutus* were obtained from PNCM-BIOTECH of the University of the Philippines Los Baños. Initially, *C. minutus* culture (100 ml) was inoculated into three one liter sterile flasks containing BG 11 medium [2]. The mass cultivation set up run for 14 days under light condition (fluorescent white lamps with light intensity of $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and incubated at a mean temperature of $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. The cyanobacterial biomass was harvested via centrifugation set at 10,000 rpm for 10 min. The algal pellet was rinsed several times with sterile water and freeze-dried using a lyophilizer (Virtis Freeze mobile 25 SL) [2].

Preparation of Cyanobacterial Extract

Dried and pulverized biomass of *C. minutus* (1 gram) was subjected to extraction using 20 ml methanol in an ultrasonic bath for 30 minutes with continuous stirring for 1 hr. The sample mixture was concentrated (via centrifugation) at 12,000 rpm for 20 min at a temperature of 20°C . The algal extract was further concentrated using a rotary evaporator set at 40°C under reduced pressure. The concentrated algal extract was kept under refrigerated condition (4°C) to preserve its biological activity for use to different biological assays needed in the study [2,6].

Determination of total phenolic content (TPC)

The TPC of *C. minutus* was determined following the method proposed by Nuñez-Selles et al. [7]. Initially, about 0.5 ml of *C. minutus* crude extract was mixed with 0.5 ml 10% sodium carbonate solution and 0.5 ml of Folin-Ciocalteu's reagent for 1 minute. The sample mixture was allowed to stand for 5 minutes at ambient temperature. Furthermore, the volume of the sample mixture was adjusted

using 5 ml sterile distilled water. Absorbance reading of all the sample mixture was measured at 720 nm using an Ultraviolet-Visible spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). The TPC is presented as microgram of gallic acid equivalent (GAE) per gram of the algal extract (calibration curve equation: $y = 0.0682x - 0.0214$, $r^2 = 0.997$) [2,7].

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Assay

The radical scavenging effect against DPPH of the *C. minutus* extract was analyzed using the methods done by Ribeiro et al. [8]. Briefly, 5.0 ml of 0.1 mM DPPH solution was mixed with 100 μ l of the *C. minutus* extract. The reaction mixture was mixed (via vortex mixer) and was kept at ambient temperature for 20 minutes. The absorbance readings of the different *C. minutus* extract concentrations and the controls were taken at 517 nm wavelength using a UV-VIS spectrophotometer. The scavenging inhibition activity (%) was computed using the equation:

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

where: A_{control} = absorbance reading of the control (DPPH solution without algal sample) and A_{sample} = absorbance reading of the algal extract sample (DPPH solution with test sample). Ascorbic acid was used as the control in this assay. The effective concentrations (IC_{50}) of the control antioxidant and *C. minutus* extract needed to neutralize 50% of DPPH radicals were determined using the standard curve generated from the scavenging activities of different concentrations of the algal extract [8,2].

Antibacterial Activity

Three Gram-negative bacteria (*Aeromonas hydrophila* BIOTECH 10089, *Pseudomonas aeruginosa* BIOTECH 1824, and *Escherichia coli* BIOTECH 1634) and three Gram-positive bacteria (*Bacillus cereus* BIOTECH 1509, *Listeria monocytogenes* BIOTECH 1958, and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* BIOTECH 10378) were tested against *C. minutus* crude extract using microtiter plate dilution assay. These reference pathogens were obtained from PNCM, BIOTECH-UPLB. The bacterial strains used in this study are known bacterial pathogens reported in the Philippines causing diseases such as listeriosis, gastroenteritis, food poisoning, cellulitis, sepsis, and urinary tract infections (Table 1) [9]. Thus, the antibacterial assay was done to assess the effectivity of the algal extract against these medically-important bacterial pathogens. Initially, bacterial pathogens were pre-cultivated using Luria Bertani broth medium and incubated at with shaking for 24 hours at 37 °C. Purity and viability of each test organisms were regularly monitored by conducting regular biochemical tests and morphological characterization [2,9]. Microtiter plate dilution (two-fold serial dilution technique) assay was used to determine the antibacterial activities of *C. minutus* extract [2,9]. Briefly, 100 μ l of broth cultures of the bacterial pathogens (cell density of 1×10^6 cells/ml) were gently mixed with 100 μ l of *C.*

minutus extract set at different dilutions (1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$, $\frac{1}{64}$, and $\frac{1}{128}$ of algal crude extract concentrations). The antibacterial assay was done in triplicates and were incubated for 12 hours in an incubator set at 35°C. After incubation, antibacterial activity of *C. minutus* extract against different bacterial pathogens were taken [2,9].

Table 1. Bacterial pathogens used in the assay and their respective pathogenicity

Bacterial Pathogen	Pathogenicity (Diseases)
Gram-positive bacteria	
<i>Bacillus cereus</i> BIOTECH 1509	Food poisoning and gastrointestinal illness: emetic (vomiting) syndrome and the diarrhoeal syndrome
<i>Listeria monocytogenes</i> BIOTECH 1958	Causes listeriosis
Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> BIOTECH 10378	Food poisoning and infection in hospitals
Gram-negative bacteria	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BIOTECH 1824	Generalized inflammation and sepsis
<i>Aeromonas hydrophila</i> BIOTECH 10089	Gastroenteritis in humans; ulcers, tail rot, fin rot and hemorrhagic septicemia in fish
<i>Escherichia coli</i> BIOTECH 1825	Gastrointestinal and urinary tract infection

α -Glucosidase Inhibition Assay

The ability of *C. minutus* extract to inhibit α – glucosidase was assessed by spectrophotometric assay using *p*-nitrophenyl- α -glucopyranoside (*p*NPG) following the methods of Nair et al. [10]. The presence of α -glucosidases in algal extract converts *p*NPG (substrate) to *p*-nitrophenol (*p*NP) and is measured spectrophotometrically at 410 nm wavelength. Initially, a mixture containing 75 μ l of α – glucosidase (2.5 U/ml), 100 μ l of algal extract or 100 μ l of 0.1 M phosphate buffer pH 6.8 (for the case of the control) were mixed in sterile test tubes. The total volume of the mixture was adjusted to 500 μ l by adding 30 μ l of 10mM *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (Sigma N1337) and 295 μ l buffer before incubation. The mixtures were then incubated at 37°C for 12 minutes after which 3 mL of 50 mM NaOH were added in the mixture [6,10]. Absorbance reading of each reaction mixtures (samples) was taken at 410 nm. The percent α – glucosidase inhibition was determine using the equation below:

$$\alpha - \text{Glucosidase Inhibition (\%)} = \left(\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

Statistical Analyses

The data obtained from the experiments are given as means \pm standard deviations (mean \pm SD) of three replicates [2]. In addition, correlation analysis was done using MS Office Excel 2017.

RESULT AND DISCUSSION

Total Phenolic Content and Antioxidant Activity

Bioactive compounds from cyanobacteria such as carotenoids, polyunsaturated fatty acids, mycosporine-like amino acids (MAAs), phenolic compounds, and polysaccharides are known potent antioxidants [11]. However, limited reports are available on the antioxidant properties, identification, and quantification of these compounds and its important role in the algal defense against exposure to high concentration of reactive oxygen species (ROS) [12]. Polyphenols are secondary metabolites found in several cyanobacterial species which can be tapped nowadays for pharmaceutical application because of the reported potent antioxidant, antibacterial, and antidiabetic properties [11,12,13]. The TPC of *C. minutus* is 11.27 ± 0.14 mg GAE/g extract. This result was greater than those observed from other cyanobacteria such as *Lyngbya* sp., *Oscillatoria* sp., *Spirulina* sp., and *Microcystis* sp. with TPC of 5.02 ± 0.20 , 2.96 ± 0.14 , 1.78 ± 0.07 , and 2.65 ± 0.14 mg GAE/g, respectively [13]. However, Singh et al. [14] reported that cell-free extract of *Anabaena dolium*, *Calothrix geitonos*, *Oscillatoria ocuta*, and *Nostoc elliposporum* have higher TPC than *C. minutus*, which are 47.77 ± 3.4 , 22.80 ± 2.3 , 290.23 ± 2.2 , and 39.03 ± 1.8 mg GAE/g, respectively. In general, variations in the amount of phenolic compounds in the cyanobacterial extract is dependent on the extraction protocol, type and polarity of solvent used in the extraction as well as solubility of algal polyphenols in the extraction solvents [11,12].

Table 2. DPPH radical scavenging activity and IC₅₀ value of *Chroococcus minutus* extract and ascorbic acid

<i>Chroococcus minutus</i>		Ascorbic Acid	
Phenolic concentration (µg GAE/ml)	DPPH ⁺ Inhibition (%)	Concentration (µg/ml)	DPPH ⁺ Inhibition (%)
100	30.28 ± 0.21	100	18.86 ± 0.21
200	43.97 ± 0.84	200	38.12 ± 0.37
300	55.02 ± 0.58	300	57.16 ± 0.42
400	62.69 ± 1.10	400	76.43 ± 0.89
500	71.32 ± 0.05	500	91.35 ± 0.37
IC₅₀*	255 µg/ml	IC₅₀*	262 µg/ml

*IC₅₀ is the effective concentration that inhibits the activity of DPPH radical by 50%. Computed by interpolation.

Phenolic compounds derived from cyanobacteria are potent free radical scavengers. These compounds are capable of scavenging DPPH by donation of electron or hydrogen atom provision. Phenolic compounds transform DPPH into a colorless product (2, 2-diphenyl-1- hydrazine), causing a decrease in optical density of the sample extract [15]. The antioxidant activity of *C. minutus* extract was evaluated using the DPPH radical scavenging assay. Results showed that the activity against DPPH free radicals increased when the concentration of *C. minutus* extract (100 - 500 µg/ml) increases (Table 2). The IC₅₀ value of the cyanobacterial extract (255 µg/ml) showed a more potent antioxidant activity than

that obtained from the control antioxidant, ascorbic acid with IC_{50} of 262 $\mu\text{g/ml}$. The antioxidant activity of *C. minutus* is considered more effective than those obtained from other species of cyanobacteria such as *Calothrix brevissima*, *Westiellopsis prolifica*, *Scytonema simplex*, and *Anabaena constricta* with IC_{50} value of 2.24 ± 0.18 , 3.52 ± 0.26 , 1.42 ± 0.19 , and 0.91 ± 0.04 mg/ml , respectively [14]. Antioxidant activity of cyanobacteria may be associated to several polyphenols (such as gallic acids, vanillic acids, quercetin, ferulic acids, kaempferol, and rutin) present in *C. minutus* extract. These active substances are reported to have potent free radical scavenging ability [14]. In addition, factors such as strains of the cyanobacteria and culture growth conditions may also show an important effect on the amount and profile of phenolic compounds (in the extract) and thus affecting the antioxidant activity of the algal extract [2,14].

Antibacterial Activity

Cyanobacteria are good sources of active metabolites with potent antimicrobial activities. These reported antimicrobial activities are associated with various intracellular and extracellular metabolites that are produced by several strains of this group of cyanobacteria with known diverse biological activities [16,17]. *Chroococcus minutus* exhibited antibacterial activities against known pathogenic bacteria (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*) (Table 3). The antibacterial property of *C. minutus* extract against *B. cereus* and *L. monocytogenes* is comparable to those observed from extracts of *Moorea producens* which exhibited minimum inhibitory concentration (MIC) value of 250 $\mu\text{g/ml}$ for both bacterial pathogens [18]. In addition, *C. minutus* extract exhibited effective antibacterial activity against MRSA like that of *Nostoc* sp. with reported MIC value of 0.8 $\mu\text{g/ml}$ [19]. The antibacterial activity exhibited by *C. minutus* in this study may be associated to known secondary metabolites in cyanobacteria such as gallic acids, quercetin, ferulic acids, and kaempferol which are toxic to several microorganisms such as bacteria [16,19]. The study also reported that *C. minutus* extract did not exhibit antibacterial activities against Gram-negative bacteria (Table 3). In general, *C. minutus* extract is more effective in Gram-positive than Gram-negative bacteria. These differences in the antibacterial activities may be associated with a multilayered structure of cell wall in Gram-negative bacteria that serve as additional barrier that protects the bacterial cells from bioactive compounds present in the algal extract [20].

α -Glucosidase Inhibition Activity

Diabetes is a metabolic disease characterized by having high concentration of glucose in blood [21]. The management of this metabolic disorder is done by lowering the postprandial increase in blood glucose levels via inhibition of important carbohydrate-degrading enzyme (α -glucosidase), responsible for the breakdown of complex carbohydrates into glucose [22]. In this study, evaluation of the potential antidiabetic activity of *C. minutus* was done *in vitro* via α -glucosidase inhibition assay. The inhibitory activity of *C. minutus* extract on the target enzyme is presented in Table 4. The algal extract exhibited a

concentration-dependent reduction in α -glucosidase inhibition. *C. minutus* extract exhibited the highest inhibition of α -glucosidase ($91.29 \pm 0.05\%$) at phenolic extract concentration of 8 μg GAE/ml. *C. minutus* extract has potent α -glucosidase inhibition property (IC_{50} of 5.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) – more effective than acarbose (IC_{50} of 6771 $\mu\text{g}/\text{ml}$) which is a known standard antidiabetic drug. The IC_{50} value of *C. minutus* extract against α -glucosidase is comparable to that observed for methanolic extract of *Arthrospira platensis* and *Cylindrospermum* sp. with IC_{50} values of 145 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 84 ± 6.8 nM, respectively [23,24]. The antidiabetic properties of cyanobacteria can be attributed to bioactive substances such as phenolic compounds, pigments, and polysaccharides that are reported to possess α -glucosidase inhibitory activity [25,26,27]. These compounds are known inhibitors of hydrogen ion (via hydrogen scavenging mechanism) that is being discharged from the active site of the target enzyme (α -glucosidase) [6,26,27]. In conclusion, *Chroococcus minutus* extract exhibited promising bioactivities such as antioxidant, antibacterial, and alpha-glucosidase inhibition properties that can be used for pharmaceutical application. It is recommended that additional studies should be done to identify the bioactive compounds present in the cyanobacterial extract. Also, *in vivo* experimental trials should be conducted to confirm the effectivity and assess the safety of *C. minutus* extract for future medical application.

Table 3. Antibacterial activities of *Chroococcus minutus* extract

Bacterial Pathogen	Antibacterial Activity
Gram-positive bacteria	
<i>Bacillus cereus</i> BIOTECH 1509	++++
<i>Listeria monocytogenes</i> BIOTECH 1958	++++
Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> BIOTECH 10378	+++
Gram-negative bacteria	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BIOTECH 1824	ND
<i>Aeromonas hydrophila</i> BIOTECH 10089	ND
<i>Escherichia coli</i> BIOTECH 1825	ND

*+ = full crude extract concentration; ++ = $\frac{1}{2}$ of crude extract concentration; +++ = $\frac{1}{4}$ of crude extract concentration; ++++ = $\frac{1}{8}$ of crude extract concentration; ND = None Detected.

Table 4. Alpha-glucosidase inhibition activity and IC₅₀ value of *Chroococcus minutus* extract and acarbose

<i>Chroococcus minutus</i>		Acarbose**	
Phenolic concentration (µg GAE/ml)	Alpha-glucosidase Inhibition (%)	Concentration (µg/ml)	Alpha-glucosidase Inhibition (%)
4	13.73 ± 0.72	2000	17.96 ± 1.36
5	34.10 ± 1.34	4000	31.69 ± 1.22
6	67.90 ± 0.91	6000	45.32 ± 1.90
7	83.08 ± 2.25	8000	57.26 ± 0.49
8	91.29 ± 0.05	10000	62.35 ± 0.49
IC₅₀*	5.5 µg/ml	IC₅₀*	6771 µg/ml

*Inhibitory concentration that inhibits alpha-glucosidase activity by 50%.

**Reference alpha-glucosidase inhibitor and anti-diabetic drug.

ACKNOWLEDGEMENT

The author acknowledges the support given by the PNCM-BIOTECH, UPLB for this research study. The author also is thankful to Mrs. Arsenia B. Sapin (Food Laboratory) for her technical assistance in the conduct of the assays needed in the study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: *E.D.L.R.A.*; Design: *E.D.L.R.A.*; Control: *E.D.L.R.A.*; Sources: *E.D.L.R.A.*; Materials: *E.D.L.R.A.*; Data Collection and/or processing: *E.D.L.R.A.*; Analysis and/or interpretation: *E.D.L.R.A.*; Literature review: *E.D.L.R.A.*; Manuscript writing: *E.D.L.R.A.*; Critical review: *E.D.L.R.A.*; Other: *E.D.L.R.A.*

CONFLICT OF INTEREST

The author declares no conflict of interest.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

The author declares that the ethics committee approval is not required for this study.

REFERENCES

1. Rao, D. B. (2015). Antibacterial activity of fresh water Cyanobacteria. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 6(3), 60-64. [\[CrossRef\]](#)
2. Arguelles, E.D.L.R. (2021). Biochemical composition and bioactive properties of *Chlorella minutissima* (Chm1) as a potential source of chemical compounds for nutritional feed supplement and disease control in aquaculture. *Current Applied Science and Technology*, 21(1), 65-77. [\[CrossRef\]](#)
3. Katircioglu, H., Beyalti, Y., Aslim, B., Yusekdag, Z., Atic, T. (2006). Screening for antimicrobial agent production of some microalgae in freshwater. *The Internet Journal of Microbiology*, 2(2), 63-72. [\[CrossRef\]](#)
4. Ray, S., Bagchi, S.N. (2001). Nutrients and pH regulate algicide accumulation in cultures of the cyanobacterium *Oscillatoria laetevirens*. *The New Phytologist*, 149, 455-460. [\[CrossRef\]](#)
5. Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102, 771-776. [\[CrossRef\]](#)
6. Arguelles, E.D.L.R., Sapin, A., B. (2021). Chemical composition and bioactive properties of *Sargassum aquifolium* (Turner) C. Agardh and its potential for pharmaceutical application. *Philippine Journal of Science*, 151(S1), 9-24. [\[CrossRef\]](#)
7. Nuñez Selles, A., Castro, H.T.V., Aguero, J.A., Gonzalez, J.G., Naddeo, F., De Simone, F., Pastrelli, L. (2002). Isolation and quantitative analysis of phenolic antioxidants, free sugars and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as a nutritional supplement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 762-766. [\[CrossRef\]](#)
8. Ribeiro, S.M.R., Barbosa, L.C.A., Queiroz, J.H., Knodler, M., Schieber, A. (2008). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry*, 110(3), 620-626. [\[CrossRef\]](#)
9. Arguelles, E.D.L.R., Sapin, A., B. (2020). Bioactive properties of *Sargassum siliquosum* J. Agardh (Fucales, Ochrophyta) and its potential as source of skin-lightening active ingredient for cosmetic application. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 10(7), 51-58. [\[CrossRef\]](#)
10. Nair, S.S., Kavrekar, V., Mishra, A. (2013). *In vitro* studies on alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts. *European Journal of Experimental Biology*, 3(1), 128-132. [\[CrossRef\]](#)
11. Vega, J., Bonomi-Barufi, J., Gomez-Pinchetti, J.L., Figueroa, F.L. (2020). Cyanobacteria and red macroalgae as potential sources of antioxidants and UV radiation-absorbing compounds for cosmeceutical applications. *Marine Drugs*, 18(12), 659. [\[CrossRef\]](#)
12. Rahul, V., Agrawal, P., Sharma, M., Shukla, S. (2016). Total phenolics, flavonoids, and antioxidant potential of organic extract of freshwater algal sample collected from a marine lake. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 45(10), 1320-1326. [\[CrossRef\]](#)

13. Hossain, M.F., Ratnayake, R.R., Meeerajini, K., Kumara, K.L.W. (2016). Antioxidant properties in some selected cyanobacteria isolated from freshwater bodies of Sri Lanka. *Food Science and Nutrition*, 4(5), 753–758. [\[CrossRef\]](#)
14. Singh, D.P., Prabha, R., Verma, S., Meena, K.K., Yandegiri, M. (2017). Antioxidant properties and polyphenolic content in terrestrial cyanobacteria. *3 Biotech*, 7(2):134. [\[CrossRef\]](#)
15. Liu, N., Fu, X., Duan, D., Xu, J., Gao, X., Zhao, L. (2018). Evaluation of bioactivity of phenolic compounds from the brown seaweed of *Sargassum fusiforme* and development of their stable emulsion. *Journal of Applied Phycology*, 30, 1955–1970. [\[CrossRef\]](#)
16. Arguelles, E.D.L.R., Laurena, A.C., Martinez-Goss, M.R. and Monsalud, R.G. (2017). Antibacterial activity, total phenolic content and antioxidant capacity of a green microalga *Desmodesmus* sp. (U-AU2) from Los Baños, Laguna (Philippines). *Journal of Nature Studies*, 16(2), 1-13. [\[CrossRef\]](#)
17. Charoonart, P., Purton, S., Saksmerprome, V. (2018). Applications of microalgal biotechnology for disease control in aquaculture. *Biology*, 7(2), 24. [\[CrossRef\]](#)
18. Dussault, D., Vu, K.D., Vansach, T., Horgen, F.D., Lacroix, M. (2016). Antimicrobial effects of marine algal extracts and cyanobacterial pure compounds against five foodborne pathogens. *Food Chemistry*, 199, 114–118. [\[CrossRef\]](#)
19. Preisitsch, M., Harmrolfs, K., Vansach, T., Pham, H.T.L., Heiden, S.E., Füssel, A., Wiesner, C., Pretsch, A., Swiatecka-Hagenbruch, M., Niedermeyer, T.H.J., Müller, R., Mundt, S. (2015). Anti-MRSA-acting carbamidocyclophanes H–L from the Vietnamese cyanobacterium *Nostoc* sp. CAVN2. *The Journal of Antibiotics*, 68, 165–177. [\[CrossRef\]](#)
20. Arguelles, E.D.L.R. (2018). Proximate analysis, antibacterial activity, total phenolic content and antioxidant capacity of a green microalga *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson. *Asian Journal of Microbiology Biotechnology and Environmental Science*, 20(1), 150-158. [\[CrossRef\]](#)
21. Priatni, S., Budiwati, T.A., Ratnaningrum, D., Kosasih, W., Andryani, R., Susanti, H., Susilaningsih, D. (2016). Antidiabetic screening of some Indonesian marine cyanobacteria collection. *Biodiversitas*, 17(2), 642-646. [\[CrossRef\]](#)
22. Ghosh, T., Bhayani, K., Paliwal, C., Maurya, R., Chokshi, K., Pancha, I., Mishra, S. (2016). Cyanobacterial Pigments as Natural Anti-Hyperglycemic Agents: An In vitro Study. *Frontiers in Marine Science*, 3, 146. doi: 10.3389/fmars.2016.00146. [\[CrossRef\]](#)
23. Jüttner, F., Wessel, H.P. (2003). Isolation of Di(Hydroxymethyl)Dihydroxypyrrolidine from the cyanobacterial Genus *Cylindrospermum* that effectively inhibits digestive glucosidases of aquatic insects and crustacean grazers. *Journal of Phycology*, 39, 26–32. [\[CrossRef\]](#)
24. Gouda, K.G.M., Kavitha, M.D., Sarada, R. (2015). Antihyperglycemic, Antioxidant and antimicrobial activities of the butanol extract from *Spirulina platensis*: antihyperglycemic effect of *Spirulina*. *Journal of Food Biochemistry*, 39, 594–602. [\[CrossRef\]](#)
25. Gradíssimo, D.G., Oliveira da Silva, V.C., Xavier, L.P., do Nascimento, S.V., Valadares, R.B.d.S., Faustino, S.M.M., Schneider, M.P.C., Santos, A.V. (2021). Glucosidase inhibitors screening in microalgae and cyanobacteria isolated from the amazon and proteomic analysis of inhibitor producing *Synechococcus* sp. GFB01. *Microorganisms*, 9, 1593. [\[CrossRef\]](#)

26. Kim K-T, Rioux L-E, Turgeon SL. (2014). Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry*, 98, 27–33. [\[CrossRef\]](#)
27. Arguelles E.D.L.R., Sapin, A.B. (2020). *In vitro* antioxidant, alpha-glucosidase inhibition, and antibacterial properties of *Turbinaria decurrens* Bory (Sargassaceae, Ochrophyta). *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 25(3). [\[CrossRef\]](#)



GENİŞ SPEKTRUMLU ANTİKANSER BİLEŞİKLER GELİŞTİRMEYE YÖNELİK POTANSİYEL BİR HEDEF: HEKSOKİNAZ-II

*A POTENTIAL TARGET FOR DEVELOPING BROAD SPECTRUM ANTICANCERS:
HEXOKINASE-II*

Mevlüt AKDAĞ^{1*} , Azime Berna ÖZÇELİK¹ 

¹Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06330, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Kanser hücrelerinin glikoza duydukları ihtiyaç sonucu solunumla ilgili metabolik yollarını yeniden düzenlemesi, kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran önemli değişimlerden biridir ve bu değişim ilk olarak 1920'li yıllarda Otto Warburg tarafından rapor edildiği için "Warburg Fenomeni" olarak bilinir. Kanser hücrelerindeki artmış glikoliz, bu yolağı önemli bir kanser hedefi haline getirir. Glikolizin ilk ve hız kısıtlayıcı basamaklarından biri olan Heksokinaz (HK) enzimi bu açıdan önemli bir hedeftir ve kanser hücrelerinde karşımıza çıkan HK-II'nin baskın olduğu fenotip bu izozime yönelik tedavilerin geliştirilmesini mümkün kılar. Medisinal kimya yaklaşımları kullanılarak bu izozime karşı selektivite sağlayan heterosiklik yapılar ve fonksiyonel gruplar belirlenerek yeni inhibitörler dizayn edilebilir.

Sonuç ve Tartışma: HK-II'ye yönelik selektif tedaviler enzimin inhibisyonunu, regülasyonunu ve ekspresyonunu temel alır. HK-II'yi hedef alan küçük moleküller yeni moleküllerin keşfi için bir temel oluşturmaktadır. HK-II'ye selektif inhibitörlerin keşfi, kansere yönelik spesifik ve geniş spektrumlu ajanların gelecekte tedavide yer alabilmesi bakımından umut verici bir gelişmedir.

Anahtar Kelimeler: Glikoliz, heksokinaz, kanser, kemoterapi, Warburg Etkisi

ABSTRACT

Objective: As a result of increased need of glucose, reprogramming the metabolic pathways related to respiration is a significant change in cancer cells which differs them from normal cells and this change is known as "Warburg Phenomenon" because firstly reported by Otto Warburg in 1920s. Increased glycolysis in cancer cells makes glycolysis pathway an important target for cancer treatment. Hexokinase (HK), first and one of the rate limiting steps of glycolytic pathway, is an important target through this perspective since the prominent phenotype in cancer cells is HK-II, this makes the development of new therapies against this isozyme possible. Using medicinal chemistry approaches new inhibitors can be designed by determining the heterocycles and functional groups providing selectivity against this isozyme.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Mevlüt Akdağ
e-posta / e-mail: mevakda@gmail.com, Tel. / Phone: +905053499305

Result and Discussion: *Selective therapies against HK-II are based on inhibition, regulation, and expression of this enzyme. Small molecules targeting HK-II provide a basis for developing novel molecules. The discovery of selective inhibitors of HK-II is a promising progress for using selective and wide spectrum agents against cancer in the future cancer therapy.*

Keywords: *Cancer, chemotherapy, glycolysis, hexokinase, Warburg Effect*

GİRİŞ

Kanser gelişimi mutasyonlardan ve epigenetik faktörlerden köken alan karmaşık bir süreçtir [1]. Bugüne kadar malignitelerin tedavisi için birçok ilaç geliştirilmiş olsa da kanserin karmaşık doğasından ötürü geliştirilen tedaviler hala yetersizdir [2].

Hücre içindeki metabolik faaliyetler enzim denilen biyolojik katalizörlerle gerçekleştirilir. Bu katalizörlerin hücre içindeki miktarının ya da etkinliğinin artması veya azalması kanser gibi bazı patolojilerle ilişkilendirilebilir ve bu da bu enzimatik yolları hastalıkların tedavisi için bir hedef haline getirir [3]. Hücre metabolizmasının yeniden düzenlenmesi kanser hücrelerinin ayırt edici özelliklerinden biridir [4].

Kanser hücrelerindeki solunumla ilgili metabolik değişiklikler 1920'li yıllarda Otto Warburg tarafından ortaya konulmuştur ve uzun zamandır "Warburg fenomeni" olarak bilinmektedir. [5,6,7]. Kanser hücrelerinin aerobik şartlarda bile hücreye fazlaca glikoz alıp, oksidatif fosforilasyona göre daha az enerji sağlayan glikoliz yolağını kullanarak enerji elde etmesi, kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran bir özelliktir. Bu ayırt edici özellik, kanser hücrelerinin bir glikoz analogu olan florodeoksiglikoz ile işaretlenmesini ve pozitron emisyon tomografisi ile tespit edilmesini sağlar [7].

Glikozun fosforilasyonunu sağlayan HK enziminin bazı izozimlerinin tümörlerde ekspresyonunun artması, regülasyonu ve lokalizasyonu tümör hücreleri için hayli avantajlı bir durum sağlamaktadır. Bu sebeple de bu enzim, kansere karşı ilaç geliştirme çalışmaları için ideal bir hedef olabilir [8]. Bu enzimi hedef alan küçük moleküller mevcuttur.

Kanser Hücrelerinde Glikoliz

Normal memeli hücrelerinde enerji üretimi temelde iki yolla olmaktadır; laktik asit fermantasyonu ve aerobik solunum. Laktik asit fermantasyonu sitozolde gerçekleşir ve evrensel bir metabolik yolak olan glikoliz ile glikoz pürivata kadar parçalanır. Pürivat sonrasında laktata indirgenir ve kan dolaşımına geçer. Aerobik solunumda ise glikolizi takiben krebs döngüsü ve oksidatif fosforilasyon reaksiyonları mitokondri içerisinde gerçekleşir. Burada substratlar CO₂ ve H₂O'ya kadar parçalanır ve enerji üretimi çok daha fazladır [9].

Kanser metabolizması ve Warburg etkisi için fosfoinositid 3-kinaz/protein kinaz B/rapamisininin memeli hedefi (PI3K/Akt/mTOR) ve hipoksi ile indüklenebilen faktör-1 (HIF-1), önemli düzenleyici mekanizmalar olarak karşımıza çıkar. PI3K yolağının Akt üzerinden glikoz taşıyıcısı ekspresyonunu (GLUT-1) artırdığı gösterilmiş ve hücreye fazla miktarda glikoz girişi ile bu yolağın aktivasyonu

ilişkilendirilmiştir. Tümör büyüdükçe hipoksik stres artar ve yeni kan damarlarına duyulan ihtiyaç da artar. HIF-1 ise normoksi şartlarında stabil olmayan alt ünitelerden oluşmuştur ve hipoksi koşullarında koaktivatör proteinler tarafından stabilize edilerek anjiyogenezi uyarır. Bu da dolaylı olarak ya da doğrudan artan glikoz alımı ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca tümör hücrelerinde HK enzimi düzeyleri, HIF-1 aktivasyonu ile artabilmektedir [10, 11].

Warburg etkisi olarak bilinen, aslında sadece kanser hücrelerinin değil tüm çoğalan hücrelerin ortak bir metabolik değişimi olarak sayılabilecek fenomen, bölünen hücrelerin temel komponentlerinin sentezi için gerekli prokürsörlere duyduğu ihtiyaçla; yani bölünen hücreler tarafından sürekli bir karbon kaynağına duyulan gereksinimle açıklanabilir. Sürekli bölünen hücrelerde lipitler, aminoasitler ve nükleotitler gibi yapı maddelerine büyük bir ihtiyaç vardır. Bu nedenle de kanser hücreleri glikozu tamamen parçalayarak enerji elde etmek yerine aynı zamanda gerekli karbon kaynaklarını sağlayarak bazı yapı maddelerini sentezler. Bu da kanser hücrelerindeki artmış glikolizi kısmen açıklamaktadır [12].

HK Enzimi ve Kanser

Glikoz hücreye GLUT'lar ile taşınır. HK GLUT'lar aracılığıyla taşınan glikozun glikoz-6-fosfata (G6P) dönüşümünü katalizleyen enzimdir ve 4 önemli izozimden oluşur; bunlar HK-I, HK-II, HK-III ve HK-IV (glukokinaz) veya A, B, C ve D'dir. Bunlar arasında çoğu tümörde Warburg fenotipinin görülmesini sağlayan HK-II'dir. HK-II başlıca adipoz dokuda ve iskelet kaslarında bulunur [13]. HK-I, II ve III'ün glikoza olan affinitesi IV'e göre daha yüksektir [8]. HK-IV eksprese eden normal hücrelerde, tümör gelişimi sırasında HK-IV ekspresyonunun susturulduğu ve HK-II ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir [14].

1960'larda yapılan çalışmalarda HK-I ve II'nin mitokondri dış membranına bağlandığı bulunmuştur. HK-II, mitokondriyal dış membran proteini olan voltaj bağımlı anyon kanalı 1'e (VDAC1) bağlanır. VDAC1, adozin nükleotit translokaz (ANT) ile etkileşim halindedir ve böylelikle mitokondriyal iç ve dış zar arasında bir bağlantı oluşturur. Mitokondriye bağlı HK'ler, glikoliz ve oksidatif fosforilasyon arasındaki bağlantıyı kolaylaştırırlar ve mitokondri tarafından üretilen ATP'ye HK'lerin erişiminde bu durum bir avantajdır. Aynı zamanda HK'lerin katalitik aktivitesi sonucu üretilen ADP'de tekrar fosforilasyon için mitokondriye yönlendirilerek metabolik bir avantaj kazanılır. Fakat bunların yanında mitokondri-HK ilişkisi apoptotik yolları düzenleyen önemli bir komponenttir. Major bir mitokondriyal ölüm yolağı, Bcl-2 ailesine ait Bak ve Bax gibi proteinlerle ve mitokondriyal permeabilite geçiş poruyla (mitokondri iç zarında oluşan büyük bir kanal-mPTP) ilişkilidir. Aktive Bak/Bax, mitokondri dış zarında apoptotik faktörlerin membranlar arası boşluktan sızmasını sağlayan bir por oluşturur. Mitokondri ilişkili HK-II, Bcl-2 ailesine ait proteinleri antagonize ederek hücreyi apoptotik uyarıdan korur. Mitokondri ilişkili HK-II, Bax'ın mitokondriye bağlanmasını yarışmalı olarak inhibe eder ve ayrıca kesilmiş Bid (tBid) ile indüklenmiş Bax/Bak aracılı apoptozisi antagonize eder.

mPTP'nin açılması ise mitokondri iç zarından dış zarına Ca^{+2} iyonlarının geçişiyle sonuçlanır ve dış zarın hasar görmesiyle de hücre nekroza gider. Mitokondri ilişkili HK-II'nin, mPTP açılmasını inhibe ettiği rapor edilmiştir [8, 14, 15].

VDAC stabilizasyonunun bozulmasının reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırdığı görülmüştür. HK-II'nin antiapoptotik etkileri VDAC konfigürasyonunu stabilize etmesiyle ilişkilidir [16].

Besin bolluğunun bulunduğu şartlar altında, rafampisin hedefi kompleks-1 (mTORC1) hücre büyümesini desteklemekte ve otofajiyi durdurmaktadır. Tan ve ark. tarafından glikoz miktarının azaldığı durumlarda HK-II'nin otofajiyi direkt mTORC1 aktivitesini inhibe ederek indüklediği gösterilmiştir [17].

Min ve ark. tarafından, inositol polifosfat 4-fosfataz tip 2 (INPP4B) ve HK-II seviyelerinin azalmasının radyorezistan-gırtlak kanseri hücrelerinde radyoterapiye duyarlılığı artırdığı gözlemlenmiştir. INPP4B, Akt-mTOR yolu üzerinden HK-II'yi indüklemekte ve aerobik glikolizi düzenlemektedir [18].

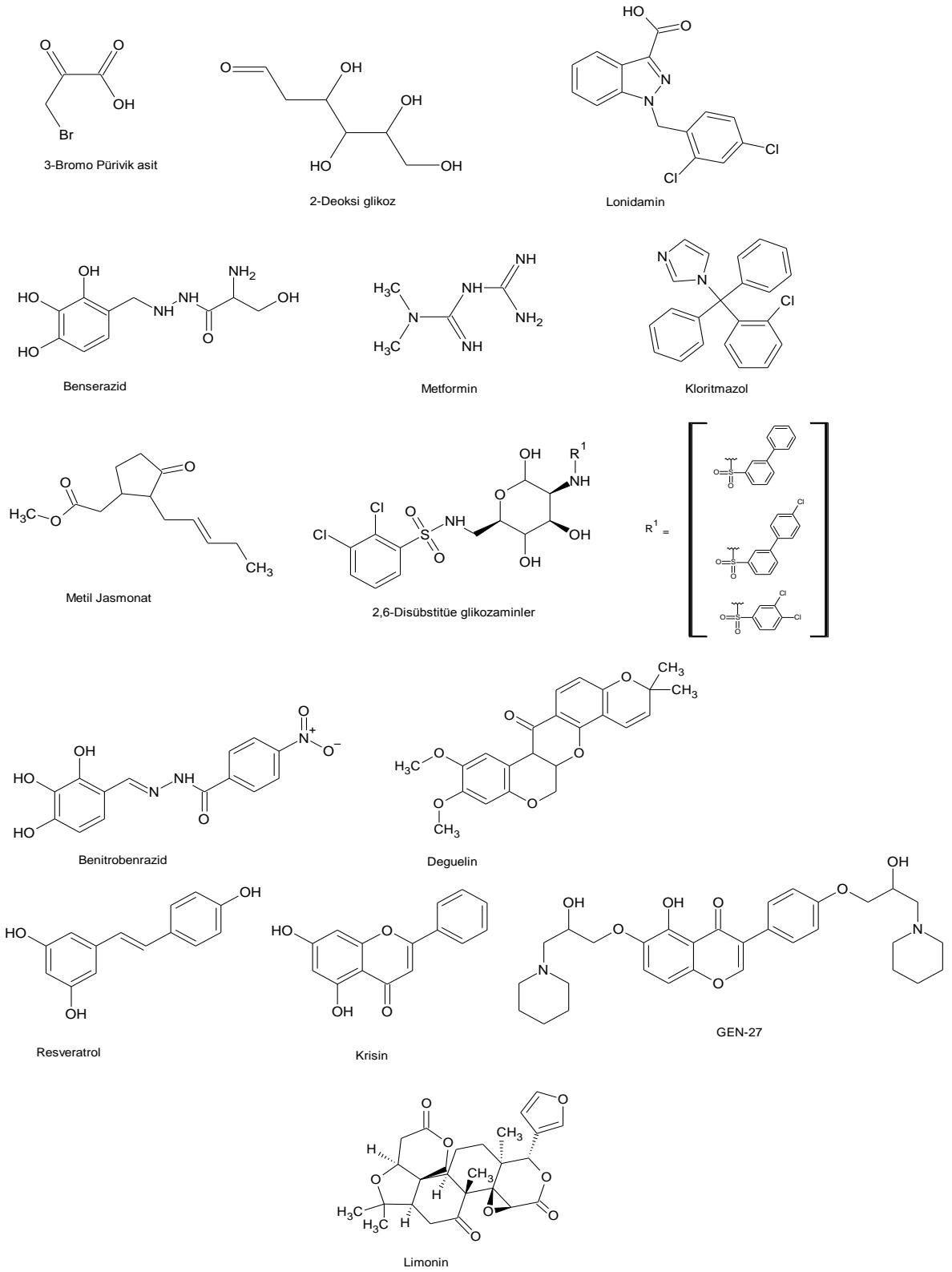
HK-II Enzimini Hedef Alan Moleküller

Kanser hücrelerinde baskın izozim HK-II olduğu için HK-II selektif bileşiklerin geliştirilmesi önem arz etmektedir. Enzimin aktif yoresinin oldukça polar olmasından ve enzimin karmaşık fonksiyonlarından dolayı ilaç geliştirme çalışmaları için zorlu bir hedeftir. Lin ve ark. tarafından HK-II için kristalografi çalışmaları yapılmış ve HK-II'ye ait ligand bağlı ko-kristal yapısı incelenmiştir [19].

Kanser için bir hedef olarak düşünüldüğünde; HK-II sentezinin direkt olarak inhibisyonu, katalitik faaliyetlerinin inhibisyonu ya da HK-VDAC etkileşiminin inhibisyonu, üzerinde durulması gereken stratejiler olarak karşımıza çıkmaktadır [8].

siRNA, genleri susturmak ve işlevlerini anlamak için kullanılmaktadır. HK-II ekspresyonunun siRNA kullanılarak susturulması; hücre döngüsünün G1 fazında kalmasına, glikoz metabolizmasının azalmasına ve tümör oluşumunun inhibisyonuna yol açmıştır [20, 21]. Bunun dışında HK enzimini hedef alan küçük moleküller, sentetik moleküller tasarlamak için iyi bir başlangıç noktası sağlayabilir.

Bir pürivat türevi olan 3-bromopürivik asit (3-BP) (Şekil 1) hücreye mono karboksilat taşıyıcıları (MCTs) ile girer. 3-BP'nin çok çeşitli hedefleri vardır ve bir alkilatör olması sebebiyle çok çeşitli makromolekülleri etkilemesi beklenen bir durumdur. *In vivo* etkinliğini, glikolitik yolları, mitokondriyal hedefleri ve tümör mikro çevresini etkileyerek açığa çıkardığı düşünülmektedir [22, 23]. Chen ve ark. tarafından 3-BP'nin, HK-II'de yaptığı kovalent modifikasyonlarla mitokondri/HK-II ayrışmasına sebep olduğu ve bu sayede de apoptotik faktörlerin salınımının gerçekleştiği rapor edilmiştir [24]. Ko ve ark. tarafından 3-BP'nin bir HK inhibitörü olduğu [25] ve yine başka bir çalışmada Ko ve ark. tarafından 3-BP'nin normal hücreler üzerinde önemli bir toksisite göstermeden hepatoselüler karsinomada *in vivo* etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir [26].



Şekil 1. Heksokinaz enzimini hedef alan küçük moleküller

2-Deoksiglikoz (2-DG) (Şekil 1), glikozun ikinci karbonundaki hidroksil grubunun yerine bir hidrojenin geldiği glikoz analogudur ve HK tarafından fosforillenir fakat 2-DG-fosfat ileri metabolizmaya uğramaz. Böylelikle de biriken fosforillenmiş ürün HK'yı inhibe eder ve dolayısıyla da glikolizi inhibe etmiş olur. Ayrıca 2-DG kan beyin bariyerini geçebilir ve birçok klinik çalışmaya girmiştir [27]. Cheng ve ark. yaptıkları çalışmada mitokondriyi hedefleyen ilaçlarla 2-DG'nin kombine kullanımının meme kanseri hücrelerine karşı sinerjik etki oluşturduğunu rapor etmiştir [28].

İlk olarak antispermatojenik ajan olarak tanıtılmış bir indazol-3-karboksilik asit türevi olan lonidamin (LND) (Şekil 1), tek başına kullanıldığında önemli bir antineoplastik aktivite göstermeyen fakat alkilleyici ajanlar gibi konvansiyonel ilaçlarla ve vemurafenib gibi hedeflenmiş ilaçlarla kombine kullanıldığında bu ilaçların etkinliğini artıran bir ajandır. LND, mitokondriye bağlı heksokinazı inaktive eder ve apoptozu tetiklediğine dair kanıtlar vardır. Ayrıca normal hücreler üzerinde etkisi çok azdır ve sadece bir etki mekanizması üzerinden etki göstermez [29]. LND'nin tek başına antineoplastik etkisinin zayıf olması ve platinlerin etkinliğini artırması göz önüne alınarak, Chen ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, LND konjuge edilmiş beş tane Pt(IV) türevi sentezlenmiş ve $[Pt(NH_3)_2(LND)Cl_3]$ bileşiğinin *in vitro* olarak cis-platin rezistansını engelleme potansiyeline sahip olduğu rapor edilmiştir [30].

Bir karbohidrazit olan benserazid (BNZ) (Şekil 1), farmakokinetik özellikleri ve toksisitesi iyi bilinen bir dopadekarboksilaz inhibitörü ilaçtır. Li ve ark. yaptığı bir çalışmada sanal tarama yöntemi ile BNZ'yi bir HK inhibitörü olarak bulmuştur. Yine aynı araştırma grubu tarafından yapılan *in vitro* çalışmalarda BNZ'nin selektif bir HK-II inhibitörü olduğu gösterilmiş ve *in vivo* çalışmalarla da tümörlü farelerde tümör büyümesinin baskılandığı bildirilmiştir. Lider bileşik olarak benserazid temel alınıp, HK-II selektif inhibitörleri olan BNZ analogları tasarlanabileceği bildirilmiştir [31].

Bir guanidin sınıfı antidiyabetik olan metformin (Şekil 1), antihiperglisemik etkilerinin yanında antikanser etkilere de sahip olduğu gösterilmiş bir ajandır. Salani ve ark. yaptığı bir çalışmada, Calu-1 hücrelerinde metforminin HK-II enzimini inhibe ettiğini ve mitokondri-HK ayrışmasını sağladığını göstermişlerdir. Yapılan *in silico* çalışmalara göre, metforminin inhibe edici etkisini, HK-II'nin bağlanma bölgesinde G6P'yı taklit etmesiyle ilişkilendirmişlerdir [32].

Bir imidazol türevi antifungal olan kloritrazol (Şekil 1) klinikte 20 seneden fazla süredir kullanılmaktadır. Adinolfi ve ark. yaptıkları bir çalışmada kloritrazolün A375 insan melanom hücrelerindeki antikanser etkilerini incelemişlerdir ve bu bileşiğin HK-II ekspresyonunu azalttığını rapor etmişlerdir [33].

Bitki stres hormonları olan jasmonatlar, antikanser etkileri bulunan küçük hidrofobik moleküllerdir. Jasmonatların moleküler hedeflerinin incelendiği bir çalışmada Goldin ve ark. metil jasmonatın (Şekil 1) HK-I ve II'ye bağlanıp mitokondri-HK ayrışmasını sağladığını göstermişlerdir. 4 ayrı kanser tipine karşı (murin melanom B16, murin kolon karsinom CT26, murin B hücre lösemi BCL1,

insan T lenfoblastik lösemi hüce hattı Molt-4) metil jasmonat etkili bulunmuş ve geniş spektrumlu bir antikanser ajan olarak etkili olabileceği gösterilmiştir [34].

Lin ve ark. yüksek çıktılı tarama (high throughput screen) sonucunda bir glikoz amin türevi bileşiği zayıf HK-II inhibitörü olarak bulmuşlardır ve yaptıkları kristalografi ve yapı etki ilişkileri çalışmaları sonucunda 2,6-disüstitüe glikoz amin türevlerini (Şekil 1) selektif HK-II inhibitörleri olarak rapor etmişlerdir [19].

Liu ve ark. yaptıkları bir çalışmada 6 milyondan fazla bileşiği sanal tarama yöntemiyle taramışlar ve (E)-N'(2,3,4-trihidroksibenziliden)arilhidrazid yapısını iskelet olarak belirlemişlerdir. Sonrasında 26 tane (E)-N'(2,3,4-trihidroksibenziliden)arilhidrazid yapısındaki bileşiği sentezlemiş, HK-II aktivitesini incelemiş ve insan kolon kanseri hücreleri SW840 ve insan pankreas kanseri hücreleri SW1990 hattına karşı etkisini incelemişlerdir. Daha sonra benitrobenrazid (BNBZ) ((E)-4-nitro-N'(2,3,4-trihidroksibenziliden)benzohidrazid) (Şekil 1) olarak adlandırılan lider bileşiğin HK-II aktivitesi $IC_{50} = 0.53 \pm 0.13 \mu M$ olarak belirlenmiş ve bu bileşik SW840 hücrelerine karşı $IC_{50} = 7.13 \pm 1.12 \mu M$ seviyede büyüme inhibisyonu göstermiştir [35]. Daha sonra, Zheng ve ark. yaptıkları çalışmada, BNBZ'nin HK-II ye karşı selektif bir inhibitör olduğunu ve HK-II geninin işlevsiz hale getirildiği (HK-II knockout ve knockdown) hücrelerde BNBZ etkinliğinin azaldığını göstermişlerdir [36].

Yukarıda özetlenen ajanların dışında HK-II enziminin ekspresyonunu ve işlevini etkileyen birçok molekül rapor edilmiştir. Li ve ark. deguelinin (Şekil 1) küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hücrelerinde HK-II ekspresyonunu azalttığını [37], yine Li ve ark. yaptığı bir çalışmada resveratrolün (Şekil 1) NSCLC hücrelerinde HK-II ekspresyonunu azalttığını [38], Xu ve ark. yaptıkları bir çalışmada krisinin (Şekil 1) hepatosellüler karsinomada (HCC) HK-II ekspresyonunu azaltarak tümör glikolizini inhibe ettiğini [39], Tao ve ark. sentetik bir flavonoid olan GEN-27'nin (Şekil 1) insan meme kanseri hücrelerinde HK-II ekspresyonunu azalttığını [40], Yao ve ark. limoninin (Şekil 1) HK-II/mitokondri ayrışmasını sağlayarak HCC proliferasyonu ve kolonizasyonunu *in vitro* olarak inhibe ettiğini [41] rapor etmişlerdir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

HK, glikolizin ilk basamağında glikozu substrat olarak kullanan ve enerji eldesi için glikozu metabolik değişime uğratan bir enzimdir. HK'lar arasında kanser hücrelerinde baskın izozimin HK-II olması kanser hücrelerine karşı selektif moleküllerin geliştirilebilmesine imkan veren ayırt edici özellikte bir fenotip değişimidir. Kanser hücrelerindeki solunumla ilgili metabolik değişimlerin hedeflenmesi, geniş spektrumlu antikanser ajanların elde edilebilmesi açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle de HK-II enzimini hedef alan tedavilerin geliştirilmesi kanser kemoterapisindeki başarıyı artırmaya yönelik önemli gelişmeler elde edilmesini sağlayabilir. Bu bağlamda da enzimin ligand bağlı

ko-kristalinin ve mevcut inhibitörlerinin literatürde rapor edilmiş olması ilaç geliştirme çalışmalarını hızlandıracak ve araştırmacılara yol gösterecek önemli gelişmelerdir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: M.A., A.B.Ö.; Tasarım: M.A., A.B.Ö.; Denetim: M.A., A.B.Ö.; Kaynaklar: M.A., A.B.Ö.; Malzemeler: -; Veri toplama ve/veya işleme: M.A., A.B.Ö.; Analiz ve/veya yorumlama: M.A., A.B.Ö.; Literatür taraması: M.A., A.B.Ö.; Makalenin yazılması: M.A., A.B.Ö.; Kritik inceleme: M.A., A.B.Ö.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Pirastehzad, A., Taghizadeh, A., Jamshidi, A.A. (2020). The formation of cancer stem cells in EMT6/Ro tumor: Hybrid modeling within its micro-environment. *Informatics in Medicine Unlocked*, 18, 100247. [\[CrossRef\]](#)
2. Valkenburg, K.C., de Groot, A.E., Pienta, K.J. (2018). Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(6), 366-381. [\[CrossRef\]](#)
3. Hemalatha, T., UmaMaheswari, T., Krithiga, G., Sankaranarayanan, P., Puvanakrishnan, R. (2013). Enzymes in clinical medicine: an overview. *Indian Journal of Experimental Biology*, 51(10), 777-788.
4. Bobrovnikova-Marjon, E., Hurov, J.B. (2014). Targeting metabolic changes in cancer: novel therapeutic approaches. *Annual Review of Medicine*, 65, 157-170. [\[CrossRef\]](#)
5. Warburg, O., Wind, F., Negelein, E. (1927). The metabolism of tumors in the body. *The Journal of General Physiology*, 8(6), 519-530. [\[CrossRef\]](#)
6. Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309-314. [\[CrossRef\]](#)
7. Hundshammer, C., Braeuer, M., Müller, C.A., Hansen, A.E., Schillmaier, M., Düwel, S., Feuerecker, B., Glaser, S.J., Haase, A., Weicherd, W., Steiger, K., Cabello, J., Schilling, F., Hövener, J., Kjaer, A., Nekolla, S.G., Schwaiger, M. (2018). Simultaneous characterization of tumor cellularity and the Warburg effect with PET, MRI and hyperpolarized ¹³C-MRSI. *Theranostics*, 8(17), 4765. [\[CrossRef\]](#)
8. Mathupala, S.P., Ko, Y.A., Pedersen, P.L. (2006). Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene*, 25(34), 4777-4786. [\[CrossRef\]](#)

9. Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*, New York: W.H. Freeman.
10. Courtney, R., Ngo, D.C., Malik, N., Ververis, K., Tortorella, S.M., Karagiannis, T.C. (2015). Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Molecular Biology Reports*, 42(4), 841-851. [[CrossRef](#)]
11. Kaelin Jr, W.G., Ratcliffe, P.J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular Cell*, 30(4), 393-402. [[CrossRef](#)]
12. Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029-1033. [[CrossRef](#)]
13. Gill, K.S., Fernandes, P., O'Donovan, T.R., McKenna, S.L., Doddakula, K.K., Power, D.G., Soden, D.M., Forde, P.F. (2016). Glycolysis inhibition as a cancer treatment and its role in an anti-tumour immune response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1866(1), 87-105. [[CrossRef](#)]
14. Roberts, D.J., Miyamoto, S. (2015). Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Acting on mitochondria and TORCing to autophagy. *Cell Death & Differentiation*, 22(2), 248-257. [[CrossRef](#)]
15. Miyamoto, S., Murphy, A. N., Brown, J. H. (2008). Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death & Differentiation*, 15(3), 521-529. [[CrossRef](#)]
16. Fruehauf, J.P., Meyskens, F.L. (2007). Reactive oxygen species: a breath of life or death?. *Clinical Cancer Research*, 13(3), 789-794. [[CrossRef](#)]
17. Tan, V.P., Miyamoto, S. (2015). HK2/hexokinase-II integrates glycolysis and autophagy to confer cellular protection. *Autophagy*, 11(6), 963-964. [[CrossRef](#)]
18. Min, J.W., Kim, K.I., Kim, H.A., Kim, E.K., Noh, W.C., Jeon, H.B., Cho D.H., Oh J.S., Park I.C., Hwang S.G., Kim, J.S. (2013). INPP4B-mediated tumor resistance is associated with modulation of glucose metabolism via hexokinase 2 regulation in laryngeal cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 440(1), 137-142. [[CrossRef](#)]
19. Lin, H., Zeng, J., Xie, R., Schulz, M.J., Tedesco, R., Qu, J., Erhard, K.F., Mack, J.F., Raha, K., Rendina, A.R., Szewczuk, L.M., Kratz, P.M., Jurewicz, A.J., Ceconie, T., Martens, S., McDevitt, P.J., Martin, J.D., Chen, S.B., Jiang, Y., Nickels, L., Schwartz, B.J., Smallwood, A., Zhao, B., Campobasso, N., Qian, Y., Briand, J., Rominger, C.M., Oleykowski, C., Hardwicke, M.A., Luengo, J.I. (2016). Discovery of a novel 2, 6-disubstituted glucosamine series of potent and selective hexokinase 2 inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 7(3), 217-222. [[CrossRef](#)]
20. Hu, J.W., Sun, P., Zhang, D.X., Xiong, W.J., Mi, J. (2014). Hexokinase 2 regulates G1/S checkpoint through CDK2 in cancer-associated fibroblasts. *Cellular Signalling*, 26(10), 2210-2216. [[CrossRef](#)]
21. Fang, R., Xiao, T., Fang, Z., Sun, Y., Li, F., Gao, Y., Feng, Y., Li, L., Wang, Y., Liu, X., Chen, H., Liu, X., Ji, H. (2012). MicroRNA-143 (miR-143) regulates cancer glycolysis via targeting hexokinase 2 gene. *Journal of Biological Chemistry*, 287(27), 23227-23235. [[CrossRef](#)]

22. Shoshan, M.C. (2012). 3-Bromopyruvate: targets and outcomes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 44(1), 7-15. [\[CrossRef\]](#)
23. Queirós, O., Preto, A., Pacheco, A., Pinheiro, C., Azevedo-Silva, J., Moreira, R., Pedro, M., Ko, Y.H., Pedersen, P.L., Baltazar, F., Casal, M. (2012). Butyrate activates the monocarboxylate transporter MCT4 expression in breast cancer cells and enhances the antitumor activity of 3-bromopyruvate. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 44(1), 141-153. [\[CrossRef\]](#)
24. Chen, Z., Zhang, H., Lu, W., Huang, P. (2009). Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787(5), 553-560. [\[CrossRef\]](#)
25. Ko, Y.H., Pedersen, P.L., Geschwind, J.F. (2001). Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase. *Cancer Letters*, 173(1), 83-91. [\[CrossRef\]](#)
26. Ko, Y.H., Smith, B.L., Wang, Y., Pomper, M.G., Rini, D.A., Torbenson, M.S., Hullihen J., Pedersen, P.L. (2004). Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(1), 269-275. [\[CrossRef\]](#)
27. Pruss, M., Dwucet, A., Tanriover, M., Hlavac, M., Kast, R.E., Debatin, K.M., Wirtz, C.R., Halatsch, M., Siegelin, M.D., Westhoff, M., Karpel-Massler, G. (2020). Dual metabolic reprogramming by ONC201/TIC10 and 2-Deoxyglucose induces energy depletion and synergistic anti-cancer activity in glioblastoma. *British Journal of Cancer*, 122(8), 1146-1157. [\[CrossRef\]](#)
28. Cheng, G., Zielonka, J., Dranka, B.P., McAllister, D., Mackinnon, A.C., Joseph, J., Kalyanaraman, B. (2012). Mitochondria-targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death. *Cancer Research*, 72(10), 2634-2644. [\[CrossRef\]](#)
29. Nath, K., Guo, L., Nancolas, B., Nelson, D.S., Shestov, A.A., Lee, S.C., Roman, J., Zhou, R., Leeper, D.P., Halestrap, A.P., Blair, I.A., Glickson, J.D. (2016). Mechanism of antineoplastic activity of lonidamine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1866(2), 151-162. [\[CrossRef\]](#)
30. Chen, H., Chen, F., Hu, W., Gou, S. (2018). Effective platinum (IV) prodrugs conjugated with lonidamine as a functional group working on the mitochondria. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 180, 119-128. [\[CrossRef\]](#)
31. Li, W., Zheng, M., Wu, S., Gao, S., Yang, M., Li, Z., Min, Q., Sun, W., Chen, L., Xiang, G., Li, H. (2017). Benserazide, a dopadecarboxylase inhibitor, suppresses tumor growth by targeting hexokinase 2. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 36(1), 1-12. [\[CrossRef\]](#)
32. Salani, B., Marini, C., Del Rio, A., Ravera, S., Massollo, M., Orengo, A.M., Amaro, A., Passalacqua, M., Maffioli, S., Pfeffer, U., Cordera, R., Maggi, D., Sambuceti, G. (2013). Metformin impairs glucose consumption and survival in Calu-1 cells by direct inhibition of hexokinase-II. *Scientific Reports*, 3(1), 1-8. [\[CrossRef\]](#)
33. Adinolfi, B., Carpi, S., Romanini, A., Da Pozzo, E., Castagna, M., Costa, B., Martini, C., Olsen, S., Schmitt, N., Breschi, M.C., Nieri, P., Fogli, S. (2015). Analysis of the antitumor activity of clotrimazole on A375 human melanoma cells. *Anticancer Research*, 35(7), 3781-3786.

34. Goldin, N., Arzoine, L., Heyfets, A., Israelson, A., Zaslavsky, Z., Bravman, T., Bronner, V., Notcovich, A., Shoshan-Barmatz, V., Flescher, E. (2008). Methyl jasmonate binds to and detaches mitochondria-bound hexokinase. *Oncogene*, 27(34), 4636-4643. [\[CrossRef\]](#)
35. Liu, Y., Li, M., Zhang, Y., Wu, C., Yang, K., Gao, S., Zheng, M., Li, X., Li, H., Chen, L. (2020). Structure based discovery of novel hexokinase 2 inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 96, 103609. [\[CrossRef\]](#)
36. Zheng, M., Wu, C., Yang, K., Yang, Y., Liu, Y., Gao, S., Wang, Q., Li, C., Chen, L., Li, H. (2021). Novel selective hexokinase 2 inhibitor Benitrobenrazide blocks cancer cells growth by targeting glycolysis. *Pharmacological Research*, 164, 105367. [\[CrossRef\]](#)
37. Li, W., Gao, F., Ma, X., Wang, R., Dong, X., Wang, W. (2017). Deguelin inhibits non-small cell lung cancer via down-regulating Hexokinases II-mediated glycolysis. *Oncotarget*, 8(20), 32586. [\[CrossRef\]](#)
38. Li, W., Ma, X., Li, N., Liu, H., Dong, Q., Zhang, J., Yang, C., Liu, Y., Liang, Q., Zhang, S., Xu, C., Song, W., Tan, S., Rong, P., Wang, W. (2016). Resveratrol inhibits Hexokinases II mediated glycolysis in non-small cell lung cancer via targeting Akt signaling pathway. *Experimental Cell Research*, 349(2), 320-327. [\[CrossRef\]](#)
39. Xu, D., Jin, J., Yu, H., Zhao, Z., Ma, D., Zhang, C., Jiang, H. (2017). Chrysin inhibited tumor glycolysis and induced apoptosis in hepatocellular carcinoma by targeting hexokinase-2. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 36(1), 44. [\[CrossRef\]](#)
40. Tao, L., Wei, L., Liu, Y., Ding, Y., Liu, X., Zhang, X., Wang, X., Yao, Y., Lu, J., Wang, Q., Hu, R. (2017). Gen-27, a newly synthesized flavonoid, inhibits glycolysis and induces cell apoptosis via suppression of hexokinase II in human breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 125, 12-25. [\[CrossRef\]](#)
41. Yao, J., Liu, J., Zhao, W. (2018). By blocking hexokinase-2 phosphorylation, limonin suppresses tumor glycolysis and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma. *OncoTargets and Therapy*, 11, 3793. [\[CrossRef\]](#)



SİKLİN BAĞIMLI KİNAZ 4/6 VE İNHİBİTÖRLERİ

CYCLIN DEPENDENT KINASE 4/6 AND INHIBITORS

Gülnur ARSLAN^{1*} , Tijen ÖNKOL² , Azime Berna ÖZÇELİK² 

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 32000, Isparta, Türkiye

²Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06330, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Kanser; ülkemizde ve dünyada öldürücülüğü yüksek olarak karşımıza çıkan ciddi sağlık sorunlarından biridir. İkinci sıklıkta görülen kanser türü olan meme kanseri kadınlarda en fazla ölüm nedenidir. Kanser hücrelerinin oluşum mekanizmalarının aydınlatılmasıyla, ilaç tedavilerinde bir çok yenilikçi yaklaşım keşfedilmiştir. Yenilikçi yaklaşımlardan biri de siklin bağımlı kinaz 4/6 inhibisyonudur. Bu derlemede siklin bağımlı kinaz 4/6 hakkında genel bilgiler verilerek, inhibitörlerinin avantaj ve dezavantajları üzerinde durulmuştur.

Sonuç ve Tartışma: Östrojen reseptörü pozitif ve insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 negatif meme kanserlerinde, endokrin tedavilere direncin gelişmesi tedavi sürecini kısıtlayan bir unsurdur. Retinoblastoma proteini pozitif meme kanserlerinde endokrin direncin üstesinden gelmek ve kanserli hücrenin mitoz kontrol noktasında durdurulması hedeflenerek siklin bağımlı kinaz 4/6 inhibisyon yolu keşfedilmiştir. Siklin bağımlı kinaz 4 / 6 inhibitörlerinin endokrin tedaviyle kombinasyonu kanser terapisinde ümit verici sonuçlar elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antitümör ajan, kanser terapisi, meme kanseri, siklin bağımlı kinaz 4/6 inhibitörleri

ABSTRACT

Objective: The cancer is one of the serious health problems with high lethality in our country and also in the world. Breast cancer, the second most common type of cancer, is the most common of death in woman. Many innovative approaches have been discovered in drug treatments by elucidating the mechanisms of cancer cell formation. One of the innovative approaches is inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6. In this review, general information about cyclin-dependent kinase 4/6 is given and the advantages and disadvantages of its inhibitors are emphasized.

Result and Discussion: The development of resistance to endocrine therapies is a factor limiting the treatment process in estrogen receptor positive and human epidermal growth factor receptor 2 negative breast cancers. Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibition pathway was discovered in retinoblastoma protein-positive breast cancers by targeting to overcome the endocrine resistance and arrest the cancerous cell at the mitosis

* **Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** Gülnur Arslan
e-posta / e-mail: gulnurarslan@sdu.edu.tr, Tel./ Phone: +905068042093

checkpoint. Promising results in cancer therapy have been obtained with the combination of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors with endocrine therapy.

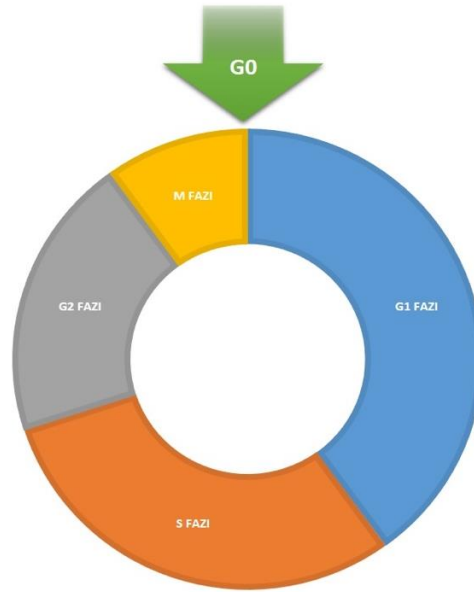
Keywords: Antitumor agent, cancer therapy, breast cancer, cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors

GİRİŞ

Siklinler hücre döngüsü düzenleyicileri arasında en önemli protein ailelerindedir. Siklinlerin insanlarda ve diğer ökaryotların çoğunda bulunan dört temel tip vardır: G1 siklinler, G1 / S siklinler, S siklinler ve M siklinler [1].

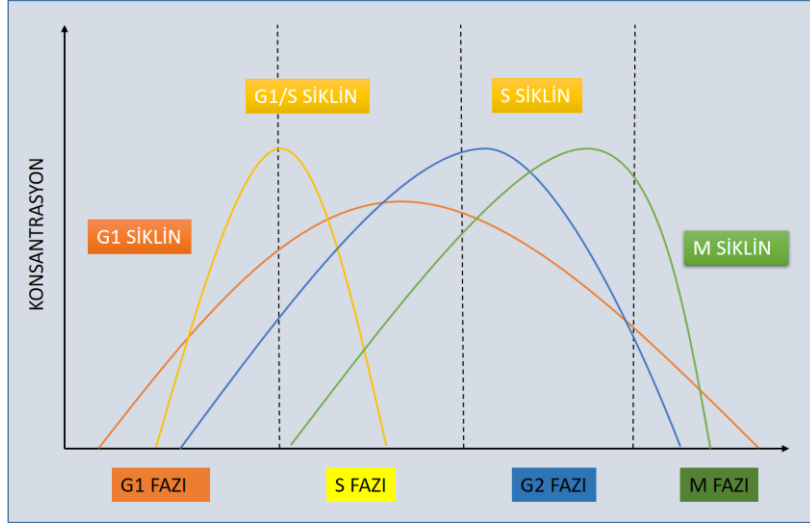
Her siklin, hücre döngüsündeki (Şekil 1) belirli bir faz, geçiş veya fazlar dizisi ile ilişkilidir ve bu fazın olaylarını yönlendirmektedir. Her bir fazda ilgili siklinlerin konsantrasyonu değişir ve döngü boyunca siklin sentezi ve yıkımı devam etmektedir [2].

Sikline bağımlı kinazlar (CDK), hücre döngüsü ilerlemesi ve RNA transkripsiyonunun kritik düzenleyicileridir. Genetik ve epigenetik olaylar, insan kanserinde hücre döngüsü CDK'larının aşırı aktivitesine neden olur ve bunların inhibisyonu, hem hücre döngüsü durmasına hem de apoptoza yol açar [3].



Şekil 1. Hücre döngüsü

Siklin bağımlı kinaz (CDK), hücre döngüsü ilerlemesi, transkripsiyon ve nöronal fonksiyonun kontrolünde rol oynayan memeli heterodimerik serin / treonin kinaz ailesinin katalitik alt birimleridir. CDK'ın katalitik aktivitesi, düzenleyici bir alt birimin bağlanmasını gerektirdiğinden, CDK terimi genellikle aktif heterodimerik kompleks için kullanılır. CDK'yı hücre döngüsü sırasında sentezlenen siklinler aktive eder ve CDK aktivasyonu tamamlandıca siklin seviyesi hızla azalır (Şekil 2) [4].



Şekil 2. Hücre döngüsünde siklin seviyeleri

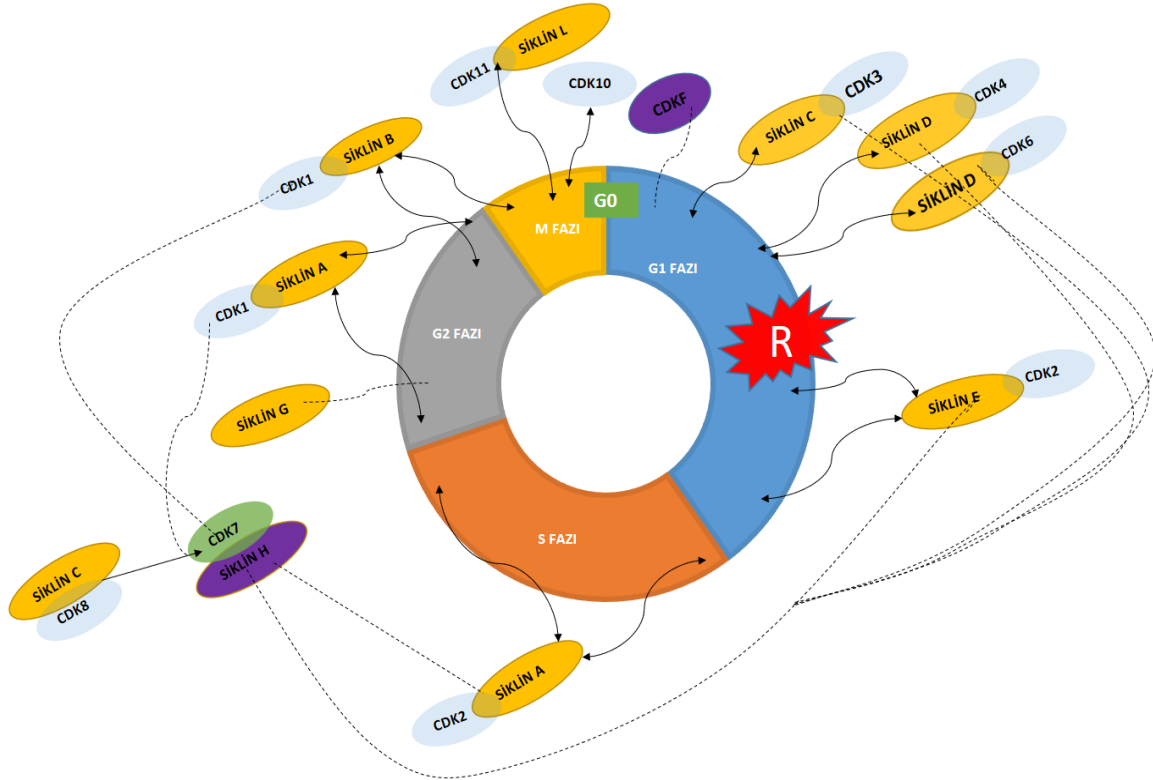
G1, hücrelerin bölünmesinde bir sonraki aşamaya (S) güvenli şekilde ilerlemek için gerekli olan tüm bilgilerin edinildiği hücre döngüsünün ilk aşamasıdır. Hücreler, aktif olarak çoğalıyorsa (M / G1 geçişi) sitokinezi tamamladıktan sonra veya daha önce döngüden çıkmışlarsa (G0 / G1 geçişi) G0 olarak bilinen durgun bir durumdan G1'e girerler. Hücre kültürü deneylerinde, mitojenik stimülasyondan birkaç saat sonra hücrelerin mitojen bağımsız hale geldiği gösterilmiştir. Ayrıca mitojenlerin uzaklaştırılması, G0'a dönmelerini sağlar. Mitojen bağımlılığından mitojen bağımsızlığına bu kritik geçiş, kısıtlama (R) noktası olarak adlandırılmaktadır. Genellikle, bu geçiş G1 fazını erken ve geç G1'e bölmek için kullanılır. Her durumda, R noktası bir 'geri dönüşü olmayan noktayı' temsil eder, bundan sonra hücreler yeni replikasyon döngüsüne geçiş yapar. R noktasından geçişi düzenleyen mekanizmaların düzgün kontrolü, normal hücre proliferasyon seviyelerini korumak hiperplastik veya neoplastik büyümeyi önlemek için gereklidir [5].

Hücre Döngüsünde CDK4 / 6 ve Diğer CDK'ların Rolü

Hücre döngüsü düzenlemesinde CDK1, CDK2, CDK3, CDK4 ve CDK6'nın doğrudan rolleri vardır. CDK7, CDK8, CDK9, CDK10 ve CDK11'in DNA sentezi ve transkripsiyon düzenlemesinde ve CDK5'in postmitotik fonksiyonları mevcuttur [4].

CDK4-SiklinD, CDK6-SiklinD ve CDK3-SiklinC kompleksleri, pRb (retinoblastoma proteini) fosforile ederek G0 / G1 geçişini (hareketsiz hücrelerde) ve G1'in erken evrelerini düzenler. CDK2-SiklinE kompleksleri, mitojenik olarak bağımsız olan pRb'nin fosforilasyonunu tamamlar ve G1 / S geçişinde, DNA replikasyonunda rol oynar. CDK2 daha sonra S fazında ilerleme sırasında Siklin A ile birleşir. CDK1, Siklin A ve Siklin B'ye sırayla bağlanarak S / G2 ve G2 / M geçişlerine katılır. CAK (CDK aktive edici kinaz), tüm hücre döngüsü CDK'larını fosforile eder. CDK7, hem aktivasyon segmentinde (T döngü) rol oynar hem genel transkripsiyon faktörünün bir bileşenidir. CDK8'in

transkripsiyon döngüsünün birçok aşamasında gen aktivitesini teşvik eder. CDK9 RNA Polimeraz II'nin en büyük alt birim C-terminali alanını fosforile ederek işlev görür. CDK10 / 11 nörogenezde nöron apoptotik sürecinin negatif düzenlenmesinde ve beyin, göz, karaciğer, ve peritoneal bölgede histon fosforilasyonuna katılır. CDK10 ve CDK11 mitozda rol oynayabilir, ancak bunların aktif olduğu fonksiyonel bölgeler iyi anlaşılmamıştır. Son olarak, G1'e giriş için Siklin F gerekir ve Siklin G, G2 / M geçişi sırasında DNA hasar yanıtında rol oynar (Şekil 3) [6].



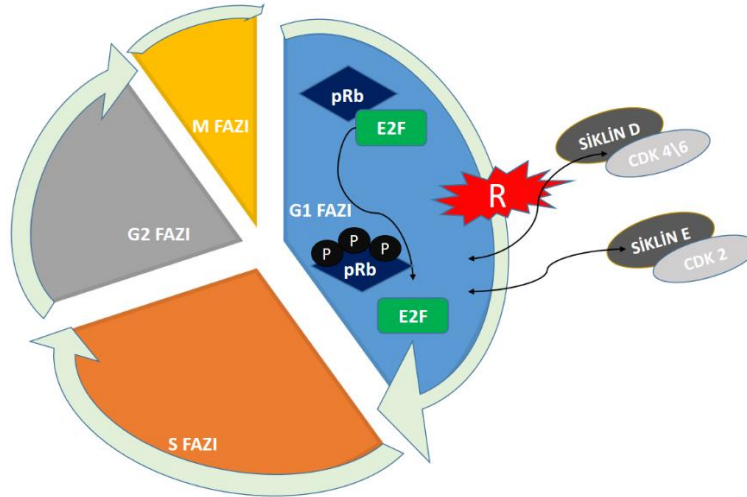
Şekil 3. Hücre döngüsünde CDK'ların rolü

G1 fazının erken evrelerinde ilk gerçekleşen olaylardan biri, sinyal iletim yolunun son noktası olan D-tipi siklinlerin sentezi olduğunu bilinmektedir [5]. D tipi siklinlerin varlığı, birbiriyle yakından ilişkili iki kinaz olan CDK4 ve CDK6'ya katalitik aktivite kazandırır. Aktif Siklin D-CDK4 / 6 kompleksi hücrelerin R noktasından ve erken G1 fazından geçmesine yardımcı olur. Bu, iki bağımsız mekanizma ile gerçekleşir. İlk olarak, CDK4 / 6-Siklin D, Siklin E1'in sentezi için gerekli E2F (ökaryotlarda transkripsiyon faktörleri ailesini kodlayan gen) transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile sonuçlanan pRb'yi fosforile eder. İkincisi, Siklin D-CDK4 / 6 kompleksleri, birincil rolü Siklin E-CDK2 aktivitesini inhibe etmek olan hücre döngüsü inhibitörleri ailesini, siklin bağımlı kinaz inhibitör proteinlerini yani CIP / KIP ailesini bağlar. Heterotrimerik Siklin D-CDK4 / 6-CIP / KIP komplekslerinin oluşumu, bu inhibitörlerin uzaklaştırılmasıyla Siklin E-CDK2 komplekslerinin inaktive edilmesini önleyerek G1 ilerlemesine katkıda bulunur (Şekil 3) [8].

D-tipi siklinler (D1, D2 ve D3), hücre dışı sinyal yollarının ana hedefleridir. Mitojenik sinyaller D-tipi siklin ekspresyonu sonucu CDK4 / 6'nın hücre içinde konsantrasyonunun artmasına neden olur [7]. G1 sırasında D-tipi siklinlerin spesifik antikorlarla bloke edilmesi hücrelerin S fazına girmesini önler. Benzer şekilde, D-tipi siklinlerin aşırı ekspresyonu in vitro olarak G1 / S geçişini hızlandırır [9].

Hücre Döngüsünde CDK İlişkili İnhibitör Proteinler ve İşlevleri

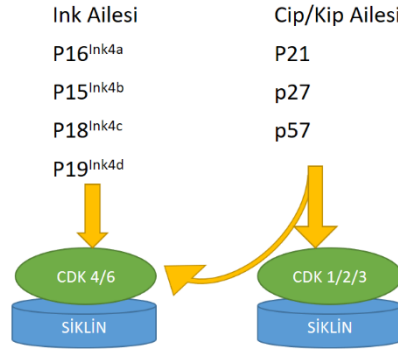
pRb, hücre döngüsünde hücreyi G1'den S fazına ilerletmek için gerekli olan sayısız genin ekspresyonunu düzenlemesine izin verir. pRb'nin proteinleri bağlama ve düzenleme kabiliyeti büyük ölçüde fosforilasyon durumu ile belirlenir. pRb hipofosforile olduğunda, E2F dahil olmak üzere bağlanma bölgesiyle ilişki kurabilir. Bu bağlanma E2F'nin hedef genlerini aktive etmesini önler. E2F'ye bağlı pRb, transkripsiyonu aktif olarak bastırır. pRb'nin fosforilasyonu, E2F'nin salınması ve daha sonra DNA sentezi için gerekli genlerin aktivasyonu ile sonuçlanır. G1 Siklin / CDK komplekslerinin bazıları fosforilasyon için pRb proteinini hedefler [10].



Şekil 4. Rb'nin hücre döngüsündeki rolü

pRb fosforilasyonu, tek bir kinaz tarafından değil, her biri bir pRb'nin fosforilasyon bölgelerinin bir alt grubunu fosforile eden bir Siklin/CDK kombinasyonu ile gerçekleşir [11].

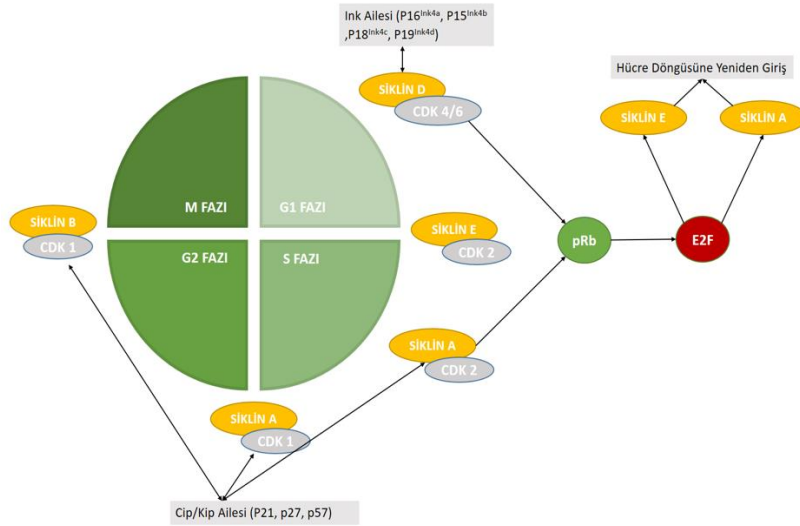
Hücre döngüsünde kontrol basamağı olan R noktasından geçiş Rb protein ailesi, pRb, p107 ve p130 tarafından düzenlenmektedir [12]. G1'in başlangıcında, Rb proteinleri, çok sayıda proteini bağlamalarına izin veren aktif, fosforlanmamış bir durumda bulunur. pRb'ye bağlanma, fizyolojik hedeflerinden sekestrasyon yoluyla veya inaktif kompleksler oluşturarak fonksiyonel inaktivasyonuna neden olur [13]. G1 sırasında, Rb proteinleri, D-tipi sikline-bağlı CDK4 / 6 ve E-tipi sikline bağlı CDK2'nin ve diğer CDK'ların aracılık ettiği ardışık fosforilasyon ile etkisiz hale getirir (Şekil 4). Rb proteinlerinin inaktivasyonu, G2 / M veya G0 sırasında inaktif olarak muhafaza edilen hücre döngüsü ilerlemesi için gerekli proteinlerin birlikte salınması ve aktivasyonu ile sonuçlanır. Dolayısıyla, Rb'nin fosforilasyon durumu ile hücre replikasyonu arasında güçlü bağlantı vardır [14].



Şekil 5. CDK4 / 6 ilişkili inhibitör protein aileleri

CDK'lar iki polipeptit inhibitörü ailesi tarafından inhibisyona tabidir : CIP / KIP ve INK4 (Şekil 5). Bu inhibitörler, elverişsiz koşullar altında hücre döngüsü geçişini durdurur. Üç proteinden oluşan CIP / KIP ailesi, CDK'larla etkileşen ve inhibe eden hücre döngüsü düzenleyicileri olarak tanımlanır. CIP / KIP protein ailesi ayrıca apoptoz, sitoskeletal yeniden düzenleme ve transkripsiyonel düzenlemeye katılır [15].

CIP / KIP ailesi üyeleri, p21^{CIP1}, p27^{Kip1} ve p57^{Kip2}, CDK-Siklin komplekslerine bağlanarak onları inhibe ederler (Şekil 5). INK4 ve CIP / KIP proteinleri, tümör baskılayıcı aktivite sergiler ve sıklıkla insan tümörlerinde farklı mekanizmalarla inaktive edilir [16].



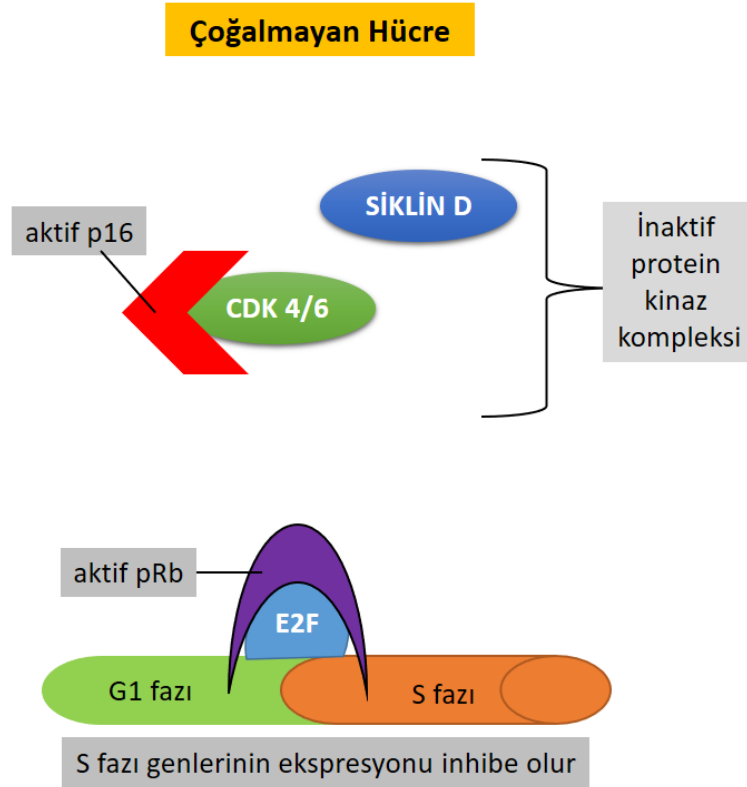
Şekil 6. CDK4 / 6 ilişkili inhibitör proteinlerin hücre döngüsündeki rolü

CIP / KIP ailesinin CKI'leri hem CDK2'ye hem de CDK4 / 6'ya bağlanır ve kinaz aktivitelerini modüle eder (Şekil 5). Hareketsiz hücrelerde, CIP / KIP CKI'leri CDK2'ye bağlanır ve aktivitesini inhibe ederek hücre döngüsü durmasına neden olur (Şekil 6). Döngüsel hücrelerde, CIP / KIP ailesinin

CKI'leri CDK2/Siklin E kompleksinden ayrılır ve bunun yerine CDK4 / 6'ya bağlanarak CDK2'nin ve CDK4 / 6'nın daha fazla aktivasyonuna neden olarak hücreye bağlanmasına neden olur [17].

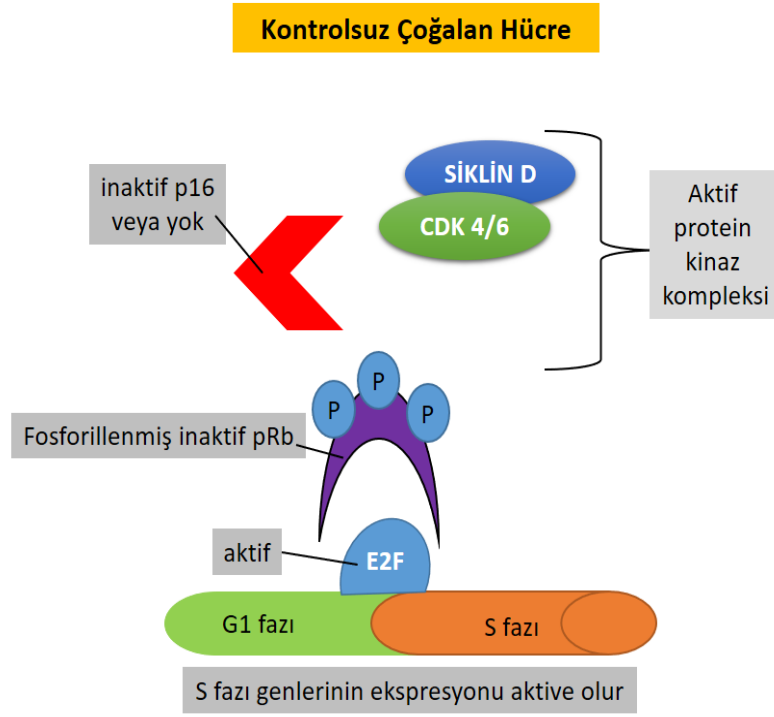
Kanser Oluşum Mekanizmasında CDK 4/6 Rolü

CDK4 / 6-Siklin D / INK4 / Rb yolu, insan kanserlerinde en sık mutasyona uğramış yollardan biridir. Sağlıklı bir hücrede döngü şu şekilde ilerler; Aktif CDK4 / 6 Rb'u fosforiller ve pRb inaktif hale gelerek, hücre siklusunu devam ettirir. M döneminde hücrel fosfatazlar ile pRb'de fosfat grupları çıkarılır. Böylece yeniden hipofosforile şekil ortaya çıkar ve pRb yeniden aktifleşerek döngüyü durdurur (Şekil 7). Kanser hücrelerinde G1 progresyonu ve S fazı başlangıcının kontrolü bozulur. CDK4 / 6 aktivitesinin ve D-tipi siklinlerin aşırı ifadesi pRb'de mutasyon, delesyon, direkt inaktivasyon veya p16'nın çok fazla eksprese olması bile siklusta supresör etki yapmaz ve hücre proliferasyonu devam eder. Kontrolsüz proliferasyon sonucunda kanser hücresi gelişimi ortaya çıkar (Şekil 8) [18].



Şekil 7. Kontrolsüz çoğalmayan hücrenin mekanizması

CDK4 çok çeşitli tümörlerde ve tümör hücre dizilerinde çoğalır ve aşırı eksprese edilir [19]. Bazıları, esas olarak gliomlar [20], sarkomlar [21], meme tümörleri [19] ve rahim serviksindeki karsinomlar [22], CDK6 geni, yassı epitel hücreli karsinomlar ve gliomlar [23] ve lenfoid tümörler [24] dahil olmak üzere belirli tipte malignitelerde çoğalır. Kromozomal translokasyonlar ayrıca bazı lenfoid tümörlerde yüksek CDK6 ekspresyon seviyelerini de açıklar.

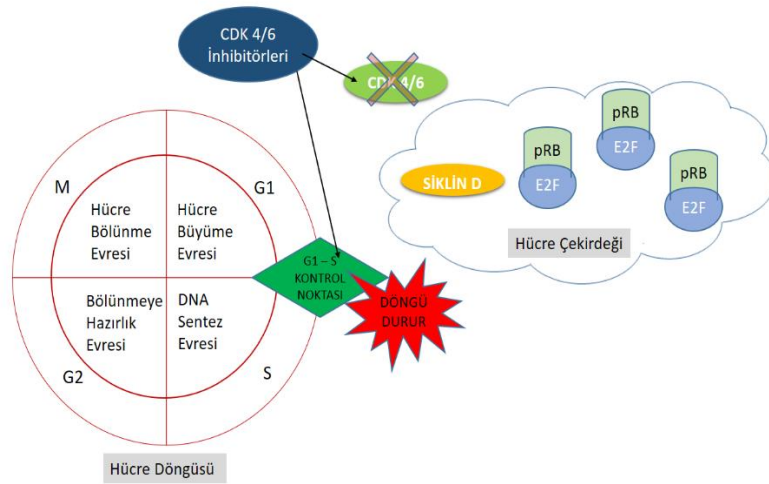


Şekil 8. KontROLSUZ çoğalan hücrenin mekanizması

Kanser tedavisinde CDK4 / 6 inhibitörleri

Üç özellik CDK inhibitörlerini potansiyel antitümör ajanları olarak çekici kılar. Birincisi, G1 veya G2 / M deki hücreleri durdurarak güçlü antiproliferatif ajanlardır (Şekil 9). İkincisi apoptozu tek başlarına veya diğer tedavilerle kombinasyon halinde tetiklerler. Üçüncüsü, bazı durumlarda, CDK'ların inhibisyonu hücre farklılaşmasına katkıda bulunur. Tanımlanan ilk CDK inhibitörleri, nispeten seçici olmadıkları ve prelinik çalışmalara dayalı olarak birçok teorik hedef dışı etkiye sahip oldukları için “pan-inhibitörler” olarak tanımlanabilir [25 , 26]. İki ana nedenden dolayı, pan-inhibitörlerinin çoğu faz II denemelerinin ötesine geçmemiştir. İlk olarak, monoterapi olarak sınırlı klinik aktivite göstermiştir [25]. İkinci olarak, muhtemelen hedef dışı etkileşimlerden kaynaklanan ciddi toksisite ile ilişkilendirilmiştir. [27].

CDK inhibitörleri, belirli bir CDK'nın hücresel süreçteki rolünü göstermek için hücre biyolojisinde farmakolojik araçlar olarak kullanıldığında, seçicilik önemli bir konudur. Bunun aksine, mutlak seçicilik, çoklu yolların düzensiz olduğu karmaşık bozuklukları iyileştirmek için en iyi yaklaşım olmayabilir. Aslında, tek bir etkiden ziyade etki kombinasyonları daha iyi terapötik maddeler sağlayabilir. Hedef aralıklarını bilmek, hem istenen farmakolojik etkiyi elde etmek için vurulması gereken hedefler dizisi hem de inhibisyonu istenmeyen enzimler hakkında bilgi sağlayarak, iyileştirilmiş klinik etkinliğe sahip ajanların geliştirilmesine yardımcı olacaktır. İyi ve kötü hedeflerin belirlenmesi, toksik yan etkilerin önlenmesine yardımcı olabilir [28].



Şekil 9. CDK4 / 6 inhibitörlerinin hücre döngüsündeki rolü

Çoğu kanser hücresi fonksiyonel Rb'yi korur ve bunun yerine CDK4 / 6 kinaz aktivitesini artırır. CDK4 / 6 kinaz aktivitesinin ablasyonu, siklin D'ye bağlı tümörlerde tümör büyümesinin tamamen inhibe edilmesine neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, sağlıklı hücrelerin, CDK1 yokluğunda zarar gördüğü ancak CDK4 / 6'nın yokluğunun üstesinden geldiği gösterilmiştir [29].

ER (östrojen reseptörü) pozitif / HER2 (insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2) negatif en yaygın meme kanseri alt tipidir ve ET (endokrin tedavisi), bu kanser tedavisinin terapötik omurgası olmaya devam etmektedir. Antiöstrojen tedavileri başlangıçta genellikle etkili olsa da, ER pozitif hastalarının yaklaşık %50'si yaşamları boyunca ET'ye direnç geliştirir ve sonuçta hastalığın tekrarlamasına ve sınırlı klinik faydaya yol açar [30].

CDK4/6 inhibitörlerinin kullanımı artık ER pozitif / HER2 negatif meme kanserlerinin bakımına entegre edilmiş olup [31] ET'ye eklenmesi, tek başına antiöstrojenlere kıyasla ER pozitif ilerlemiş meme kanserli hastaların sonuçlarını önemli ölçüde iyileştirmiştir [32].

Hücre proliferasyonunu düzenlemede CDK4 / 6 aktivitesinin önemi ve bu yolağın kanserde aktive olduğu bilinen mekanizmalar nedeniyle, CDK4 / 6 inhibitörlerinin seçici inhibisyonu çekici bir terapötik strateji olarak ortaya çıkmıştır. Tüm bu kanıtlar birlikte ele alındığında seçici bir CDK4 / 6 inhibitörünün, seçici olmayan CDK inhibitörlerden daha geniş bir terapötik pencereye sahip olabileceğini gösterir [33].

CDK4 / 6 İnhibitörlerinin Etki Mekanizması

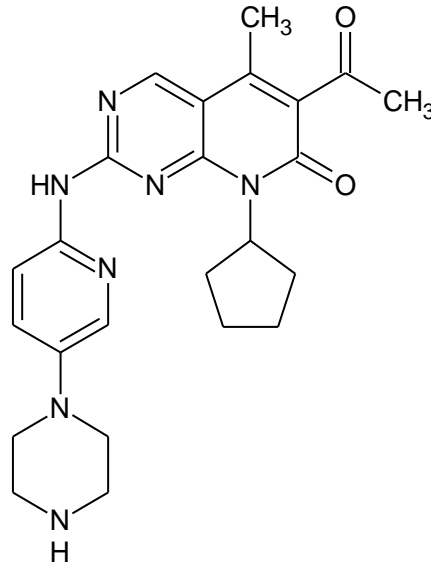
CDK4 / 6 inhibitörlerinin etki mekanizmasının mevcut bilgisi temel olarak palbosiklib ile yapılan prelinik çalışmalardan gelmektedir. CDK4 / 6 proteininin N ve C terminal lobları ATP bağlayıcı cep içerir. CDK inhibitörleri; temel olarak hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları yoluyla bağlanma için ATP ile rekabet edebilmelerini sağlayan düşük moleküler ağırlıklı hidrofobik heterosikliklerdendir. RB ve ilgili proteinlerin fosforilasyonunu bloke eder ve S-faz siklinleri ve mitotik düzenleyici genleri inhibe

eder. Nükleotid biyosentezi ve DNA replikasyonunu baskılayarak G1 / S hücre döngüsünü kuvvetle indükler. Rb pozitif meme kansinolarında DNA'ya timidin eklemesini engellediği de bildirilmiştir [15].

Palbosiklib, pan- CDK inhibitörlerinin aksine ATP bağlanma cebine sıkıca oturur. Bu, palbosiklib'in hedefi ile daha büyük bir bağlanma arayüzüne sahip olmasıyla sonuçlanır, etkinliği artırır [34].

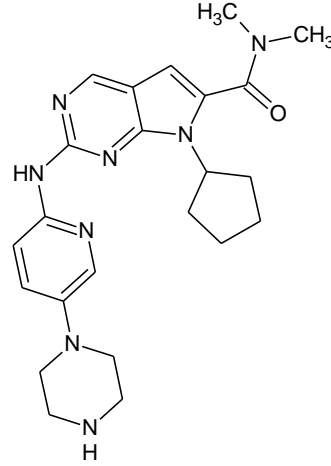
Seçici CDK4 / 6 İnhibitörleri

Pablosiklib (Şekil 10); PD 0332991 koduyla ER pozitif / HER2 negatif meme kanseri tedavisi için 2013 Nisan ayında FDA onayı almıştır. Palbosiklib CDK4 / 6 için seçicidir ve diğer otuz altı protein kinaza karşı etkinliği yoktur veya çok azdır. Rb'yi silmiş meme kanseri hücre hatlarına karşı hiçbir aktivite göstermez. Faz II çalışmasında, palbosiklib plus letrozol ile tedavi, sadece letrozole kıyasla hastalık ilerlemesi riskini % 51 azaltmıştır. Kombinasyon halinde, kemoterapi ve iyonlaştırıcı radyasyonla klinikte kullanılmaya başlanmıştır. Östrojen reseptörüne edinilmiş tamoksifen direncini yeniden hassaslaştırır [15].



Şekil 10. Pablosiklib yapısı

Ribosiklib (Şekil 11); LEE011 koduyla ER pozitif / HER2 negatif meme kanseri tedavisi için 2017 Mart ayında FDA onayı almıştır. Manto hücreli lenfoma, liposarkom, melanom akciğer kanseri pankreas kanseri tedavisi için faz çalışmaları devam etmektedir. Ribosiklib ve 3-fosfoinositid bağımlı protein kinaz 1 (PDK1) inhibitörü GSK2334470'in kombinasyonu, meme kanseri hücre hatlarında proliferasyonu kuvvetle bastırıldığı gözlenmiştir. Akciğer karsinomu hücre hatları ve primer tümör örneklerinde, ribosiklib, CDK4 / 6'ya karşı, palbosiklib'den daha seçici bulunmuştur [35].

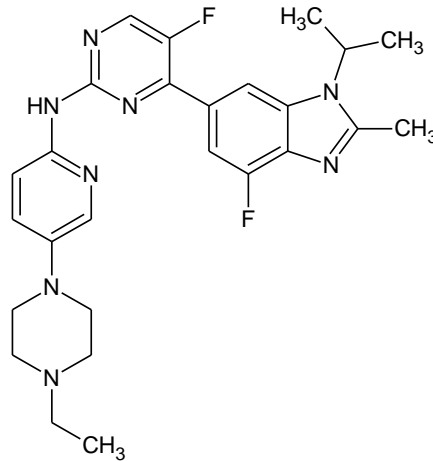


Şekil 11. Ribosiklib yapısı

Abemasiklib (Şekil 12); LY2835219 koduyla ER pozitif / HER2 negatif meme kanseri tedavisi için 2018 Şubat ayında FDA onayı almıştır. Abemasiklib CDK4'e karşı CDK6'ya göre 14 kat daha etkili olduğu bildirilmiştir.

Palbosiklib ve ribosiklibe kıyasla 5 kat daha aktiftir. Diğer CDK4 / 6 inhibitörlerinden farkı kan beyin bariyerini geçebilmesidir. Abemasiklibin LogP değeri ribosiklib ve palbosiklibin yaklaşık 2 katı bu da ATP yarığına bağlanma kolaylığı sağlamaktadır [36].

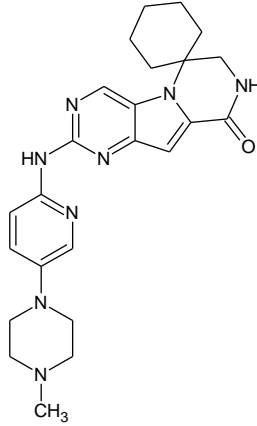
Lys43 ile oluşturduğu hidrojen bağı abemasiklibi CDK4 / 6 ya karşı daha az seçici yapar ve bunun sonucunda CDK 9 inhibisyonu gerçekleşir [37].



Şekil 12. Abemasiklib yapısı

Trilasiklib (Şekil 13); üçlü negatif meme kanseri hastaları için gemitabin ve karboplatin ile kombinasyon halinde, faz III çalışmalarını bitirmiş en yeni CDK4 / 6 inhibitörüdür [38]. Diğer

inhibitörlerden farkı reseptöre bağlanırken ATP yarışmalı değildir [39]. G1T2812 koduyla 2021 Şubat ayında FDA onayı almıştır [40].



Şekil 13. Trilasiklib Yapısı

CDK4 / 6 İnhibitörlerinin Terapideki Yeri

ER pozitif meme kanseri tedavisi için birçok endokrin tedavisi mevcuttur, ancak klinikte çoğu hastada başarısız sonuçlanmıştır. CDK4 / 6 inhibisyonu, endokrin tedavisinde direncin üstesinden gelmek için önemli bir mekanizmadır. Palbosiklib, meme kanserli hastalarda tek bir ajan olarak çalışılmış ancak klinikte yanıt oranları (toplam popülasyonda % 5) oldukça düşük bulunmuştur. İlk klinik çalışmalardan ümit verici sonuçlar palbosiklib'in, endokrin tedavisi ile kombinasyon halinde araştırılmasına yol açmıştır [41].

CDK4 / 6 inhibitörlerinin biyolojik fonksiyonunu sınırlayan etmen antitümör etkilerinin, aktif bir Rb proteininin varlığına bağlı olmasıdır. Palbosiklib, letrozol ile kombinasyon halinde, ER pozitif / HER2 negatif ileri meme kanserli hastalar için FDA'dan hızlandırılmış onay almıştır [42].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Kanserli hücre döngüsünün düzensizliği, kanser hücrelerinde ilaç ve endokrin tedavilerine karşı direnç kazanılması terapötik olarak seçici hedefe odaklanılmasını ve yeni tedavi yaklaşımlarını zorunlu hale getirmiştir. Hücre döngüsü elemanlarından biri olan CDK'lara baktığımızda kanser tedavisinde seçici olarak hedefe odaklanılabilecek kinaz ailesindedir. Tüm CDK'ların inhibisyonu ile yapılan klinik çalışmalar sonucunda gözlemlenen istenmeyen etkiler, yine seçici bir hedefe odaklanılmasının önemini bir kez daha vurgulamıştır. Hücre döngüsünün kontrol noktasında önemli görev üstlenen CDK4 / 6'nın kanserli hücrelerde hiperaktivasyonu gözlenmektedir. Kanser hücresinde mitoz kontrolsüzlüğüne neden olan CDK4 / 6'nın aşırı aktivasyonun keşfiyle beraber, CDK4 / 6 inhibitörleri yeni teröpatik hedef haline gelmiştir. Hücre mitozu girmeden, döngüyü durdurmayı hedefleyen yaklaşım CDK4 / 6'yı inhibe etmektir. Klinik çalışmalarda; seçici olarak CDK4 / 6'yı inhibitörlerinin, pan-CDK inhibitörlerine

kıyasla istenmeyen etkileri azalttığı ve sağlıklı hücreleri de koruduğu gösterilmiştir. CDK4 / 6 aktivitesinin inhibisyonu bilhassa meme kanserinde umut verici bir terapötik yaklaşımdır.

YAZAR KATKILARI

Kavram: G.A., T.Ö.; Tasarım: G.A., A.B.Ö.; Denetim: G.A., T.Ö., A.B.Ö.; Kaynaklar: T.Ö.; Malzemeler: G.A.; Veri toplama ve/veya işleme: G.A.; Analiz ve /veya yorumlama: G.A.; Literatür taraması: G.A.; Makalenin yazılması: G.A., A.B.Ö.; Kritik inceleme: A.B.Ö.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., Jackson, R. B. (2014). Campbell biology, Boston: Pearson, p.1309.
2. Hochegger, H., Takeda, S., Hunt, T. (2008). Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(11), 910-916. [\[CrossRef\]](#)
3. Shapiro, G. I. (2006). Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *Journal of Clinical Oncology*, 24(11), 1770-1783.
4. DiPippo, A. J., Patel, N. K., Barnett, C. M. (2016). Cyclin- dependent kinase inhibitors for the treatment of breast cancer: past, present, and future. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 36(6), 652-667. [\[CrossRef\]](#)
5. Pardee, A. B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(4), 1286-1290. [\[CrossRef\]](#)
6. Malumbres, M., Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(11), 630-641. [\[CrossRef\]](#)
7. Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science*, 274(5293), 1672-1677. [\[CrossRef\]](#)
8. Sherr, C. J., Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development*, 13(12), 1501-1512. [\[CrossRef\]](#)
9. Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M. J., Pagano, M., Draetta, G. (1993). Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes & Development*, 7(5), 812-821. [\[CrossRef\]](#)

10. Kasten, M. M., Giordano, A. (1998). pRb and the cdks in apoptosis and the cell cycle. *Cell Death & Differentiation*, 5(2), 132-140. [[CrossRef](#)]
11. Mittnacht, S. (1998). Control of pRB phosphorylation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8(1), 21-27. [[CrossRef](#)]
12. Sherr, C. J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*, 79(4), 551-555. [[CrossRef](#)]
13. Harbour, J. W., Dean, D. C. (2000). Chromatin remodeling and Rb activity. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(6), 685-689. [[CrossRef](#)]
14. Bartek, J., Lukas, J. (2001). Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Letters*, 490(3), 117-122. [[CrossRef](#)]
15. Roskoski Jr, R. (2016). Cyclin-dependent protein kinase inhibitors including palbociclib as anticancer drugs. *Pharmacological Research*, 107, 249-275. [[CrossRef](#)]
16. Ruas, M. (1998). The p16/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1378, 115-177. [[CrossRef](#)]
17. Chim, C. S., Liang, R., Fung, T. K., Kwong, Y. L. (2005). Infrequent epigenetic dysregulation of CIP/KIP family of cyclin-dependent kinase inhibitors in multiple myeloma. *Leukemia*, 19(12), 2352-2355. [[CrossRef](#)]
18. Ortega, S., Malumbres, M., Barbacid, M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1602(1), 73-87. [[CrossRef](#)]
19. An, H. X., Beckmann, M. W., Reifenberger, G., Bender, H. G., Niederacher, D. (1999). Gene amplification and overexpression of CDK4 in sporadic breast carcinomas is associated with high tumor cell proliferation. *The American Journal of Pathology*, 154(1), 113-118. [[CrossRef](#)]
20. He, J., Allen, J. R., Collins, V. P., Allalunis-Turner, M. J., Godbout, R., Day, R. S., James, C. D. (1994). CDK4 amplification is an alternative mechanism to p16 gene homozygous deletion in glioma cell lines. *Cancer Research*, 54(22), 5804-5807.
21. Wei, G., Lonardo, F., Ueda, T., Kim, T., Huvos, A. G., Healey, J. H., Ladanyi, M. (1999). CDK4 gene amplification in osteosarcoma: reciprocal relationship with INK4A gene alterations and mapping of 12q13 amplicons. *International Journal of Cancer*, 80(2), 199-204. [[CrossRef](#)]
22. Cheung, T. H., Yu, M. M. Y., Lo, K. W. K., Yim, S. F., Chung, T. K. H., Wong, Y. F. (2001). Alteration of cyclin D1 and CDK4 gene in carcinoma of uterine cervix. *Cancer Letters*, 166(2), 199-206. [[CrossRef](#)]
23. Costello, J. F., Plass, C., Arap, W., Chapman, V. M., Held, W. A., Berger, M. S., Huang H-J. S., Cavenee, W. K. (1997). Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA. *Cancer Research*, 57(7), 1250-1254. [[CrossRef](#)]

24. Chilosi, M., Doglioni, C., Yan, Z., Lestani, M., Menestrina, F., Sorio, C., Benedetti A., Vinante F., Pizzolo G., Inghirami, G. (1998). Differential expression of cyclin-dependent kinase 6 in cortical thymocytes and T-cell lymphoblastic lymphoma/leukemia. *The American Journal of Pathology*, 152(1), 209. [\[CrossRef\]](#)
25. Asghar, U., Witkiewicz, A. K., Turner, N. C., Knudsen, E. S. (2015). The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(2), 130-146. [\[CrossRef\]](#)
26. Cicenas, J., Kalyan, K., Sorokinas, A., Jatulyte, A., Valiunas, D., Kaupinis, A., Valius, M. (2014). Highlights of the latest advances in research on CDK inhibitors. *Cancers*, 6(4), 2224-2242. [\[CrossRef\]](#)
27. Rizzolio, F., Tuccinardi, T., Caligiuri, I., Lucchetti, C., Giordano, A. (2010). CDK inhibitors: from the bench to clinical trials. *Current Drug Targets*, 11(3), 279-290. [\[CrossRef\]](#)
28. Knockaert, M., Greengard, P., Meijer, L. (2002). Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(9), 417-425. [\[CrossRef\]](#)
29. Hamilton, E., Infante, J. R. (2016). Targeting CDK4/6 in patients with cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 45, 129-138. [\[CrossRef\]](#)
30. Razavi, P., Chang, M. T., Xu, G., Bandlamudi, C., Ross, D. S., Vasan, N., Cai, Y., Bielski, C. M., Donoghue, M. T. A., Jonsson, P., Penson, A., Shen, R., Pareja, F., Kundra, R., Middha, S., Cheng, M. L., Zehir, A., Kandoth, C., Patel, R., Huberman, K., Smyth, L. M., Jhaveri, K., Modi, S., Traina, T. A., Dang, C., Zhang, W., Weigelt, B., Li, B. T., Ladanyi, M., Hyman, D. M., Schultz, N., Robson, M. E., Hudis, C., Brogi, E., Viale, A., Norton, L., Dickler, M. N., Berger, M. F., Jacobuzio-Donahue, C. A., Chandarlapaty, S., Scaltriti, M., Reis-Filho, J. S., Solit, D. B., Taylor, B. S., Baselga, J. (2018). The genomic landscape of endocrine-resistant advanced breast cancers. *Cancer Cell*, 34(3), 427-438. [\[CrossRef\]](#)
31. Matutino, A., Amaro, C., Verma, S. (2018). CDK4/6 inhibitors in breast cancer: beyond hormone receptor-positive HER2-negative disease. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 10, 1758835918818346. [\[CrossRef\]](#)
32. Roberto, M., Astone, A., Botticelli, A., Carbognin, L., Cassano, A., D'Auria, G., Fabbri, A., Fabi, A., Gamucci, T., Krasniqi, E., Minelli, M., Orlandi, A., Pantano, F., Paris, I., Pizzuti, L., Portarena, I., Salesi, N., Scagnoli, S., Scavina, P., Tonini, G., Vici, P., Marchetti, P. (2021). CDK4/6 inhibitor treatments in patients with hormone receptor positive, Her2 negative advanced breast cancer: potential molecular mechanisms, clinical implications and future perspectives. *Cancers*, 13(2), 332. [\[CrossRef\]](#)
33. Roberts, P. J., Bisi, J. E., Strum, J. C., Combest, A. J., Darr, D. B., Usary, J. E., Zamboni, W. C., Wong, K. K., Perou, C. M., Sharpless, N. E. (2012). Multiple roles of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(6), 476-487. [\[CrossRef\]](#)
34. Choi, Y. J., Anders, L. (2014). Signaling through cyclin D-dependent kinases. *Oncogene*, 33(15), 1890. [\[CrossRef\]](#)

35. Tripathy, D., Bardia, A., Sellers, W. R. (2017). Ribociclib (LEE011): mechanism of action and clinical impact of this selective cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor in various solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 23(13), 3251-3262. [CrossRef]
36. Kim, E. S. (2017). Abemaciclib: first global approval. *Drugs*, 77(18), 2063-2070. [CrossRef]
37. Patnaik, A., Rosen, L. S., Tolaney, S. M., Tolcher, A. W., Goldman, J. W., Gandhi, L., Papadopoulos, K. P., Beeram, M., Rasco, D. W., Hilton J. F., Nasir, A., Beckmann, R. P., Schade, A. E., Fulford, A. D., Nguyen, T. S., Martinez, R., Kulanthaivel, P., Li, L. Q., Frenzel, M., Cronier, D. M., Chan, E. M., Flaherty, K. T., Wen, P. Y. Shapiro, G. I. (2016). Efficacy and safety of abemaciclib, an inhibitor of CDK4 and CDK6, for patients with breast cancer, non-small cell lung cancer, and other solid tumors. *Cancer Discovery*, 6(7), 740-753. [CrossRef]
38. Lima, C. M. S. R., Roberts, P. J., Priego, V. M., Divers, S. G., Thomas, M. B., Boccia, R. V., Stabler, K., Andrews, E., Malik, R. K., Aljumaily, R., Hamm, J. T., Chiu, V. K., Richards, D.A., Nikolinakos, P., Hussein, M. A., Schuster, S. R., Hoyer, R. J., Shapiro, G., Dragnev, K. H., Owonikoko, T. K. (2017). Trilaciclib (G1T28): a cyclin dependent kinase 4/6 inhibitor, in combination with etoposide and carboplatin (EP) for extensive stage small cell lung cancer (ES-SCLC)-phase 1b results. *Journal of Clinical Oncology*, 35(suppl), 8568. [CrossRef]
39. Tan, A. R., Wright, G. S., Thummala, A. R., Danso, M. A., Popovic, L., Pluard, T. J., Han, H. S., Vojnović, Ž., Vasev, N., Ma, L., Richards, D. A., Wilks, S. T., Milenković, D., Yang, Z., Antal, J. M., Morris, S. R., O'Shaughnessy, J. (2019). Trilaciclib plus chemotherapy versus chemotherapy alone in patients with metastatic triple-negative breast cancer: a multicentre, randomised, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 20(11), 1587-1601. [CrossRef]
40. Drugs.com Web site (2000). Retrieved March 4, 2021, from <https://www.drugs.com/history/cosela.html> Erişim Tarihi: 24.04.2021
41. O'leary, B., Finn, R. S., Turner, N. C. (2016). Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 13(7), 417-430. [CrossRef]
42. Knudsen, E. S., Witkiewicz, A. K. (2017). The strange case of CDK4/6 inhibitors: mechanisms, resistance, and combination strategies. *Trends in Cancer*, 3(1), 39-55. [CrossRef]



HEDEFE YÖNELİK TEDAVİDE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR: LUTESYUM-177 İLE İŞARETLİ RADYOFARMASÖTİKLER

CURRENT APPROACHES TO TARGETED THERAPY: LUTETIUM-177 LABELED RADIOPHARMACEUTICALS

Dorukhan HIŞIR¹ , Meliha EKİNCİ¹ , Derya İLEM-ÖZDEMİR^{1*} 

¹Ege University, Faculty of Pharmacy, Department of Radiopharmacy, 35040, Izmir, Turkey

ÖZ

Amaç: Son yıllarda, hedefe yönelik radyonüklid tedavisindeki ilerlemeler sayesinde hastalıkların erken teşhis ve tedavisinde önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Tanı ve tedavi yöntemlerini birleştiren “teranostik” kavramının doğmasıyla Lutesyum-177 (Lu-177), hedefe yönelik tedavide önemli bir yer edinmiş ve bu alanda öncü bir bileşik haline gelmiştir. Bu derlemede, radyofarmasötikler, hedefe yönelik tedavi, teranostikler ve Lu-177 ile ilgili temel bilgilerin anlatılması, ¹⁷⁷Lu ile işaretli moleküler taşıyıcılar ile ¹⁷⁷Lu’dan hareketle hazırlanan radyofarmasötiklerin sunulması ve bu konularda yapılmış olan çalışmaların gözden geçirilmesi amaçlanmıştır.

Sonuç ve Tartışma: ¹⁷⁷Lu, yaydığı γ ve β ışınları sayesinde nükleer tıpta tanı ve tedavide kullanılabilen, 6,7 günlük yarı ömre sahip teranostik bir ajandır. Yüksek spesifik aktivitesi ve bu aktivite seviyelerine kolay erişimi ile nispeten uzun yarı ömrü, bu radyonüklidin klinik kullanımına olan ilginin ana faktörleri olarak değerlendirilebilir. Hedeflendirilmiş radyonüklid tedavisi için tercih edilen bir radyoizotop olan ¹⁷⁷Lu’nun klinikte nöroendokrin tümörlerin, prostat kanserinin, non-Hodgkin lenfomanın, adenokarsinomun ve karaciğer kanserinin tedavisinde ve kemik ağrısını hafifletmede kullanılabilirliği araştırılmış ve sonuç olarak ¹⁷⁷Lu’nun kanser ve ağrı tedavisinde çok büyük bir potansiyel gösterdiği bulunmuştur. Bu kullanım alanları ile Lu-177’nin, gelecekte nükleer tıp alanında önemli bir yer edineceği kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Lutesyum-177, radyonüklid, radyofarmasötik, teranostik

ABSTRACT

Objective: In recent years, thanks to advances in targeted radionuclide therapy, significant advances have been made in the early diagnosis and treatment of diseases. With the emergence of the concept of "theranostic", which combines diagnosis and treatment methods, Lutetium-177 (Lu-177) has gained an important place in targeted therapy and has become a leading compound in this field. In this review, it is aimed to explain the basic information about radiopharmaceuticals, targeted therapy, theranostics and Lu-177, to present ¹⁷⁷Lu-labeled molecular carriers and ¹⁷⁷Lu-labeled radiopharmaceuticals and to review the studies on these subjects.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Derya İlem-Özdemir
e-posta / e-mail: deryailem@gmail.com, Tel. / Phone: +902323111963

Result and Discussion: ¹⁷⁷Lu is a theranostic agent with a half-life of 6.7 days, which can be used in diagnosis and treatment in nuclear medicine thanks to its γ and β rays. Its high specific activity and easy access to these activity levels as well as its relatively long half-life can be considered as the main factors of interest in the clinical use of this radionuclide. The clinical utility of ¹⁷⁷Lu, a preferred radioisotope for targeted radionuclide therapy, in the treatment of neuroendocrine tumors, prostate cancer, non-Hodgkin lymphoma, adenocarcinoma, and liver cancer, and in alleviating bone pain, was investigated, and as a result, ¹⁷⁷Lu was found to show great potential in cancer and pain therapy. With these areas of use, we believe that Lu-177 will have an important place in the field of nuclear medicine in the future.

Keywords: Lutetium-177, radionuclide, radiopharmaceutical, theranostic

GİRİŞ

Radyofarmasi, nükleer tıpta kullanılan radyofarmasötiklerin doğru kullanımı ve üretimi üzerine çalışmalar yapan bir eczacılık bilim dalıdır. Radyofarmasi, radyofarmasötiklerin hazırlanışından hastaya sunulana kadar olan prosesi ve radyofarmasötiklerin formülasyonunu, üretim kalitesini, dozlarla bölünmesini, farmakokinetiğini ve eğer varsa vücuttaki toksisitesini inceler [1].

Radyofarmasötikler, hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılan (% 95 tanı, % 5 tedavi), farmasötik ve radyonüklidik kısım olmak üzere iki kısımdan oluşan, uygulanan hastada farmakolojik yanıt oluşturmeyen, dokuları ve organları *in vivo* hedeflemek için tasarlanmış radyoişaretli moleküllerdir [2]. İnsanlara uygulandıkları için steril olmalı, pirojen içermemeli, izotonik ve izohidrik olmalıdır. İdeal bir radyofarmasötik, kullanılacağı alana uygun enerjide olmalı, uygun foton yaymalı, uygun fiyatlı olmalı, kolay elde edilebilir olmalı, yarı ömrü kullanılacak alana uygun olmalı, kolay temin edilebilir olmalı ve hedef organda yüksek lokalizasyon sağlamalıdır [2-4].

Radyofarmasötiklerin içeriğinde bulunan ve radyoaktif parçalanmayla (bozunma) beraber çekirdeğinden alfa, beta veya gama radyasyonları yayan, radyofarmasötiğin radyoaktivitesinden sorumlu olan radyoaktif atomlara radyonüklid denir. Hastalıkların teşhisi amacıyla kullanılan radyonüklidler gama ışınması yaparken, hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılan radyonüklidler alfa, beta ışınları veya auger elektronları yayarlar. Hedeflendirilmiş tedavi, hastalıklı bölgelerin tedavisi için yüksek dozda radyasyon taşıyan radyonüklid ile hedef bölgedeki reseptörlere yüksek derecede afinite gösteren farmasötik kısmı içeren radyofarmasötikler ile sağlanır [2].

Hedeflendirilmiş radyoterapi, gelişen ve umut verici bir kanser tedavisi yöntemidir. Kanserli hücrelerin öldürülmesi biyolojik vektörler ve uygun radyonüklidler kullanılarak sağlanır [5]. Bu yaklaşımın birçok avantajı arasında radyasyonu hedefe ulaştırmadaki seçiciliği, nispeten daha az şiddetli ve seyrek görülen yan etkileri ile tedaviden önce tümör tarafından alımın değerlendirilme olasılığı bulunmaktadır. Peptid reseptörü radyonüklid tedavisi (Peptide Receptor Radionuclide Therapy, PRRT), spesifik reseptörleri aşırı eksprese eden kanser hücrelerine sitotoksik radyasyon dozu seviyeleri sağlamak için tasarlanmış biyolojik hedefleme vektörleri olarak radyoişaretli peptidleri spesifik olarak kullanan, bölgeye yönelik hedeflenmiş bir terapötik stratejidir. Nükleer tıpta tanı ve tedavi olmak üzere birbirine bağlı iki uygulamanın kombinasyonunu ifade eden ve aynı ajanı kullanan yaklaşıma teranosis

veya teranostikler denir [2,6]. Bu yaklaşım hedef doku/organa özgü moleküllerin kullanılarak ilgili bölgenin görüntüleme yöntemiyle saptanması ve ardından terapötik molekülün sorunu çözmesini içerir. Böylelikle tedavi rejimi kişiselleştirilebilir [7-11].

Lu, radyoaktif özellikler gösteren, periyodik tablodaki lantanitler grubunun son elementidir. Atom ağırlıkları 150 ile 184 arasında değişen birçok izotopu vardır. Bunlardan ^{177}Lu doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki şekilde üretilir. ^{177}Lu 'nun 208 KeV (% 11) ve 113 KeV (% 6,4) görüntülenebilir gama foton piklerinin bolluğu ve enerjisi, ^{177}Lu 'nun tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi (Single Photon Emission Computed Tomography, SPECT) ile görüntüleme için uygun bir ajan olmasını sağlar. Sintigrafik görüntüler elde etme yeteneği de, adsorbe radyasyon dozunun tümörler ve diğer organlar tarafından tahmin edilmesine yardımcı olan ^{177}Lu ile işaretli radyofarmasötiklerin hedefleme, farmakokinetik ve atılım davranışını değerlendirme fırsatı sağlar. Son yıllarda ^{177}Lu , hedeflendirilmiş radyonüklid tedavisi için tercih edilen bir radyoizotop olarak geniş çapta araştırılmaktadır [3,12-15].

Bu derleme, günümüzde gittikçe artan öneme sahip ^{177}Lu radyonüklidi ve ^{177}Lu ile hazırlanan radyofarmasötikler hakkında güncel bilgiler içermektedir.

Radyofarmasötikler

Nükleer tıpta hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılan ve radyoaktif bileşen içeren ilaçlara radyofarmasötik denir [2]. Farmakolojik olarak etki göstermeyen ilaçlar olan radyofarmasötikler, % 95 tanı amaçlı kullanılmakta olup % 5 tedavi edici etki göstermektedir. Tedavi edici etkiyi ışına yoluyla yani fiziksel olarak gösterirler [5]. Genellikle i.v. enjeksiyon yoluyla uygulandıklarından, uygulanan radyofarmasötiğin steril ve pirojeniz olmasında tüm kalite kontrol testlerinden geçmeleri gerekmektedir. Radyofarmasötikler, konvansiyonel ilaç (etken maddesi kimyasal sentez sürecinden geçirilerek üretilen ilaçlar) gibi Beşeri Tıbbi Ürünler Ruhsatlandırma Yönetmeliği'ne tabi tıbbi ürünlerdir, fakat içerdikleri radyoaktivite nedeniyle özel tıbbi ürünler olarak kabul edilirler [16,17].

Radyofarmasötikler iki kısımdan oluşur. Bu kısımlar radyonüklidik ve farmasötik kısım olarak adlandırılır. Radyofarmasötiklerde farmasötik kısım hedef organa karşı bir ligand görevi gösterir. Radyonüklid ise ışınlar (radyasyon) yaparak hedef organın görüntülenmesini sağlayarak etki gösterir. Radyofarmasötikler hedeflenen dokuya bağlanacak olan farmasötik kısma radyonüklidin kimyasal olarak bağlanmasıyla elde edilirler. Bu olaya radyoişaretleme denir. Radyofarmasötiklerin etki edeceği süre ve raf ömrü içeriğinde bulunan radyonüklidik kısımların stabilitesine bağlıdır [16,18].

Tanısal Radyofarmasötikler

Tanı amacıyla kullanılacak radyofarmasötiğin seçiminde, moleküler stabilite, maliyet, üretim kolaylığı, enerji (100-250 KeV arası olmalı), saf gama ışını yayma, hedeflenen bölgeye tutulum ve parenteral kullanım açısından uygunluk önemli parametrelerdir. Teşhiste kullanılacak olan radyonüklidler genellikle tek enerjili gama (γ) ışını yayan ve dokulara penetrasyonu yüksek olan

radyonüklidlerdir. Teknesyum-99m (Tc-99m), İndiyum-111 (In-111), İyot-123 (I-123), Talyum-201 (Tl-201), Galyum-67 (Ga-67) ve I-131 gibi teşhiste kullanılan radyonüklidlerin ürettikleri gama ışınları dedektörler tarafından algılanarak görüntü elde edilir. Hastalıkların teşhisinde en çok tercih edilen radyonüklid Tc-99m'dir ve bu radyonüklid sadece monoenerjetik gama ışını (140 KeV) yayar. Fiziksel yarılanma ömrü 6 saat olan Tc-99m'in, i.v. olarak verildiğinde ise vücuttan atılma süresi 24 saattir [4,17].

Terapötik Radyofarmasötikler

Terapötik radyofarmasötikler, vücutta yüksek özgüllükle spesifik olan belirli hastalık bölgelerine (en sık tümörler) iyonlaştırıcı radyasyonu terapötik dozlarda sunmak üzere tasarlanmış radyoşaretli moleküllerdir. Tedavide kullanılan radyofarmasötikler daha ağır ve iyonize olma gücü daha fazla olan radyofarmasötiklerdir. Bu radyofarmasötikler kolaylıkla absorbe olma özelliğine sahiptir. Tedavide kullanılacak olan radyofarmasötiklerde radyonüklidin enerjisinin 1 MeV'den büyük olması tercih edilir. Radyofarmasötiklerle yapılan tedavilerde temel amaç hastalıklı veya hasarlı bölgeye iyonlaştırıcı radyasyon vermektir. İyonlaştırıcı radyasyon vererek hastalıklı bölgeye hasar verilmiş olur [5]. Tedavi için kullanılacak radyofarmasötiklerin genellikle alfa veya beta parçacık içermesi istenir. Beta parçacık yayan radyofarmasötikler dokuda daha iyi dağılım göstermelerinden ve menzillerinin daha uzun olmalarından dolayı alfa parçacık yayan radyofarmasötiklere göre üstündür. Alfa parçacıklarının menzilleri birkaç μm olup yeterince mesafe katedemediklerinden kısa mesafelerde enerjilerinin tamamını kaybederler ve beta parçacıklarına göre daha az homojenite sağlarlar [19-20]. Tedavide kullanılacak radyofarmasötiklerde etkin yarı ömür (günler, haftalar) genellikle uzundur. Radyofarmasötiğin yüksek hedef/hedef dışı oranı tedavinin etkinliğini artırır [20,21].

Beta partikül yayıcı radyonüklidler, nispeten uzun yol uzunluğuna (0,8-5 mm) ve düşük doğrusal enerji ($0,2 \text{ KeV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$) aktarımlarına (Linear Energy Transfer, LET) sahip olduklarından yaygın olarak kullanılan radyoterapötiklerdir. Beta partiküllerinin emisyonu ve dönüşüm elektronları ile bozunan radyonüklidler, büyük tümör hacimlerini tedavi etmek için uygunlukları nedeniyle radyoterapötik uygulamalar için sıklıkla kullanılmaktadır. Çapraz ateşleme etkisine sahip İtriyum-90 (Y-90) veya Renyum-188 (Re-188) gibi beta yayıcılar, zayıf perfüze ve hacimli tümörlerin tedavisi için daha uygunken, Lu-177 gibi düşük enerjili beta yayıcılar küçük metastazları hedeflemek için daha uygundur [3,22].

Alfa parçacıkları, doğrusal izleri boyunca yüksek yoğunluklu iyonizasyon üreten yüksek enerjili helyum çekirdekleridir. Bu monoenerjetik parçacıklar enerjilerini kısa aralıklarda biriktirir. Alfa parçacıkları çok daha yüksek enerjiye (4-9 MeV) sahiptir, ancak dokuda sadece birkaç hücre çapı (yani 40-100 μm) boyunca hareket ederek moleküler hedeflemede etkili bir şekilde kullanılır. Hedeflendirilmiş radyonüklid tedavisi için alfa parçacıklarının bir başka özelliği de, büyüklükleri ve yükleri nedeniyle enerjinin nispeten kısa mesafelerde birikerek yüksek LET ($\sim 100 \text{ KeV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$) ile

sonuçlanmasıdır. Alfa parçacıkları, geleneksel dış X-ışını radyasyonundan veya beta parçacıklarından daha fazla DNA'yı geçerken, nispeten yoğun iyonizasyon olayları yoluyla 100-1000 kat daha fazla enerji kaybeder. İyonlaşma olayları arasındaki ortalama mesafe, iki DNA ipliği arasındaki mesafeye eşleştiğinden, yüksek alfa parçacığı doğrusal enerji transferi DNA'da çift iplikli kırılmalar yaratır. Radyonüklid tedavisinde alfa yayan radyonüklidler olarak Bizmut-212 (Bi-212) ve Astatin-211 (At-211) kullanılmaktadır [22,23].

Radyoaktif bozunma sırasında yayılan düşük enerjili Auger elektronlarının çoğu, enerjilerini hücresel boyutlarda biriktirerek bozunma bölgesinin hemen yakınında oldukça lokalize bir enerji yoğunluğu üretir. Auger-elektron yayıcıların hücre çekirdeğine dahil edilmesi yüksek radyotoksisiteye neden olur [3,23].

Hedefe Yönelik Tedavi

Hedefe yönelik tedavi, radyonüklidlerin belirli biyolojik bölgelere taşınması/hedeflenmesi için moleküler vektör görevi gören ajanların kullanıldığı bir tedavi yöntemidir. Hedeflendirilmiş tedavide kullanılmak üzere tasarlanan ajanlar hedeflenen bölgelere özgü bir afiniteye sahip taşıyıcı molekülün varlığı nedeniyle hedef özgüllüğü ile donatılmıştır. Hedeflendirilmiş tedavi sayesinde hastaların vücutlarındaki kanserin algılanması ve bu kanserin evrenmesi için bir çok muayeneden geçmesine gerek kalmamaktadır. Nükleer görüntüleme teknikleri, morfolojik değişiklikleri tespit edebilen anatomik görüntülemenin aksine, fizyolojik değişikliklerin tespitine dayanan non-invaziv bir görüntüleme tekniğidir [22,23].

Radyoimmünoterapi kanser tedavisinde önemli bir rol oynar. Kanserli hücrelerde tümörle ilişkili olan antijenlere karşı yönlendirilmiş radyonüklid ile işaretlenmiş monoklonal antikolar kullanarak tedavide etkin rol bir sağlar. Tümörle ilişkili antijene spesifik olarak verilen antikor, dozun normal hücrelerden çok tümörlü hücrelere dağılmasını sağlar. Terapötik radyofarmasötiklerin en çok istenen özellikleri, hedefe yeterli radyasyon dozu sunabilme, radyonüklidi taşıyan metaboliti koruyabilme ve hedeflenmemiş doku ve organlardan radyoaktivitenin hızlı bir şekilde temizlenmesini sağlayabilme yeteneğidir [3,24].

Teranostikler

Son zamanlarda moleküler hedefleme vektörleri ve radyonüklidlerin uygun kombinasyonları kullanılarak tanı ve tedaviye entegre bir yaklaşım anlamına gelen teranostik kavramının uygulanmasına başlanmıştır. Tedavi ve teşhis kelimelerinin bir araya getirilmesiyle oluşmuş bir kelime olan teranostik terimi birleşik kullanımı tanımlamak için ortaya çıkarılmıştır. Teranosis olarak bilinen teranostik kavramı, hastalığın tam tanısını takiben belirli bir hastada tedaviyi uyarlamak ve böylece kişiselleştirilmiş tıp kavramını tanıtmak için kullanılmaktadır [2,6]. Moleküler görüntüleme ve tanı testleri, terapötik ajanla aynı veya benzer kimyasal yapıya sahip bir tanı ajanı ile gerçekleştirilir. Hem tedavi hem de teşhis amaçlı In-111, I-131, Lu-177, Holmiyum-166 (Ho-166) gibi radyonüklidler

kullanılarak teranostik çalışmalar yapılmaktadır. Bir teranostik sistem, genellikle, spesifik olarak hedeflendirilmiş, tanısal veya terapötik radyonüklidlerle işaretlenmiş moleküler hedefleme vektörleri kullanılarak oluşturulur. Teranostikler, bir hastanın spesifik tedavisi için kullanılan süreçleri tanımlar. Bir ilaca daha uygun olan hastaları belirlemek veya bir ilacın ne kadar çalıştığını belirlemek için tanı testlerinin kullanılması olarak tanımlanır [25-27].

Nükleer tıp, teranostiklere terapötik etki sağlamak için bir tanı maddesinin dozunu artırma fırsatı sunmaktadır. Bu yöntemin avantajı, gerekli biyofarmakokinetik bilgilerin tedavi öncesi sağlanması ve dozimetreyi kritik bir organ/dokuya hapsetmek için SPECT/Bilgisayarlı Tomografi (Computed Tomography, BT) veya Pozitron Emisyon Tomografisi (Positron Emission Tomography, PET)/BT görüntüleme yöntemlerinin kullanılarak görüntüleme yapılabilmesidir. Elde edilen bilgiler, tolere edilen maksimum dozu tanımlamak için kullanılır. Görüntüleme sonuçları uygun bulunursa, genellikle aynı radyofarmasötiğin daha yüksek dozunu kullanarak hedefe yönelik moleküler tedavi sağlamak amacıyla dozun çeşitli deneylerle takip edilmesinin güvenli ve uygun olduğu kabul edilir. Bu faktörler aynı hastada kişiselleştirilmiş görüntülemenin yanı sıra aynı radyofarmasötik ile tedavi yapabilmek için özellikle önemlidir. Bu konsept kullanılarak hem tanı hem de tedavi yapılabildiğinden, teranostik tedavi rejimi kişiselleştirilmiş bir tedavi rejimidir. Belirli bir hasta için belirli bir doz planlanır. Bu durum, kişiselleştirilmiş tıbbın temelini oluşturmaktadır. Böylece, bir ilacın etkinliği, güvenliği ve uygun doz aralığı kontrol edilebilir [26,28].

Lutesyum-177

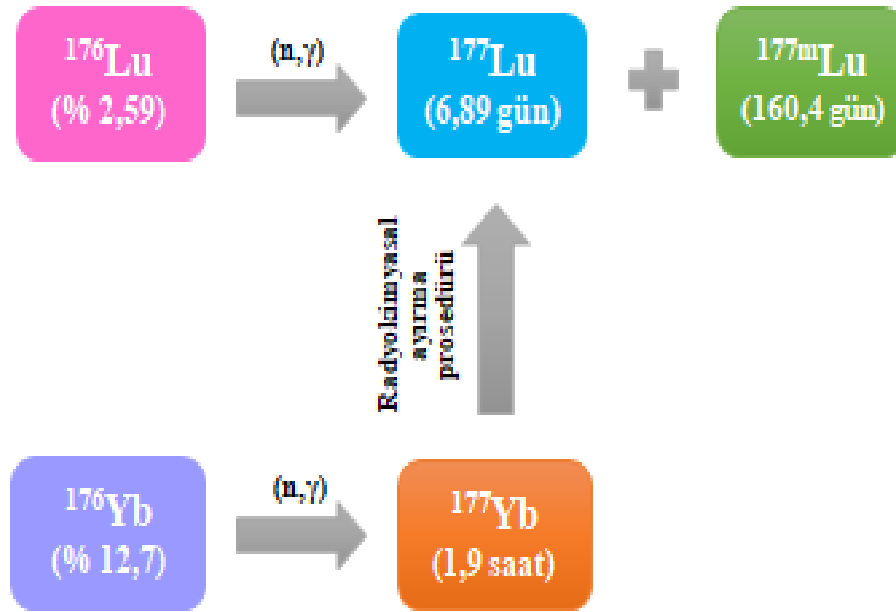
Lu, sulu ortamda üçlü pozitif Lu^{+3} iyonu oluşturan tipik bir lantanittir. Tüm bileşikleri +3 değerlik durumundadır. Tüm tuzlarının sulu çözeltileri renksizdir, kuru formları ise beyaz kristal katı maddelerdir. Nitrat, sülfat ve asetat tuzları suda çözünür ve hidratlar oluşturmak için su molekülleri ile kristalleşirken, oksit, hidroksit, florür, karbonat, fosfat ve oksalat tuzları ise suda çözünmez [3,29,30]. Doğal olarak oluşan Lu, çok uzun yarı ömürlü radyoizotop ^{176}Lu ($T_{1/2} = 3.78 \times 10^{10}$ yıl) ile birlikte stabil izotop ^{175}Lu (% 97,41) olarak bulunur. Kütle sayıları 150 (^{150}Lu) ile 184 (^{184}Lu) arasında değişen 23 nükleer izomer de dahil olmak üzere 50'den fazla Lu radyonüklidi üretilmiştir. Bunların arasında, uzun ömürlü radyonüklidler ^{174}Lu ($T_{1/2} = 3,31$ yıl) ve ^{173}Lu 'dur ($T_{1/2} = 1,37$ yıl). Kalan radyonüklidlerin yarı ömürleri 9 günden azdır ve çoğunun da yarı ömürleri 30 dakikadan azdır. Kararlı ^{175}Lu 'dan daha hafif radyonüklidler, İterbiyum (Yb) izotopları üretmek için elektron yakalama veya pozitron emisyonu yoluyla bozunur. Daha ağır radyonüklidler, Hafniyum (Hf) izotopları üreterek, esas olarak β^- emisyonu yoluyla bozunur. Lu'nun 18 yarı kararlı durumu arasında en kararlı olanı $^{177\text{m}}\text{Lu}$ ($T_{1/2} = 160,4$ gün) ve $^{174\text{m}}\text{Lu}$ 'dur ($T_{1/2} = 142$ gün). Bu yarı ömürler, karşılık gelen Lu radyonüklidlerinin temel durumlarının yarı ömürlerinden daha uzundur [31].

Lu-177'nin benzersiz kimyasal ve nükleer-fiziksel özellikler kombinasyonu ve radyonüklid tedavisindeki modern eğilimler, bu radyonüklide olan ilgiyi önemli ölçüde arttırmıştır. Tedavide geç

kullanımına rağmen Lu-177, hedefe yönelik radyonüklid tedavisinde önde gelen radyonüklidlerden biri olmayı başarmıştır. Hedeflendirilmiş moleküler tedavilerde Lu-177'nin kullanımı, tümör hücrelerinin yüzeyinde aşırı eksprese edilen hücre yüzeyi reseptörlerini hedefleyen peptidlerin kullanımını içeren moleküler ve hücre biyolojisindeki ilerlemelerden sonra artmıştır. Lu-177'nin nükleer tıp prosedürlerinde artan kullanımı ve terapötik ajanlarının yaygın uygulamaları hem hedeflendirilmiş radyonüklid tedavisinin ilerlemesini hem de bu terapötik yöntemlerin gelişmesini teşvik etmiştir [13,32].

¹⁷⁷Lu'nun Üretim Yolları

Dünya genelindeki araştırma reaktörlerinde Lu-177 için her üretim ve işleme stratejisi, Lu-177'yi kabul edilebilir radyonüklidik ve radyokimyasal saflığa sahip kimyasal bir formda elde etmek amacıyla kullanılmıştır. Lu-177, bir siklotron kullanılarak yüklü parçacık hızlandırıcısı ile de üretilebilmesine rağmen, bir nükleer reaktördeki nötron ışınlaması üretim için en pratik ve uygun maliyetli yoldur. Yüklü parçacık hızlandırma yolu ile radyoaktivite verimleri çok daha düşüktür ve işlem daha pahalıdır, bu nedenle bu yöntem pratik değildir. Bir nükleer reaktörde, Lu-177, zenginleştirilmiş Lu-176'nın doğrudan aktivasyonu kullanılarak nötron aktivasyonu ile veya Yb-176'nın aktivasyonu ve ardından Lu-177'ye β^- bozunması yoluyla dolaylı yoldan hazırlanabilir. Nükleer tıp uygulamalarında ise ¹⁷⁷Lu elde etmek için hem "doğrudan" hem de "dolaylı" reaktör üretim yolları izlenebilir: Doğrudan üretim yolu, ¹⁷⁶Lu (n, γ) ¹⁷⁷Lu reaksiyonu ile ¹⁷⁶Lu hedefinin nötron ışınlamasına dayanmaktadır. Dolaylı üretim yolu ise, ¹⁷⁶Yb (n, γ) ¹⁷⁷Yb \rightarrow ¹⁷⁷Lu ve ardından ¹⁷⁷Lu'nun ¹⁷⁶Yb hedef atomdan kimyasal olarak ayrılmasını gerektirir (Şekil 1) [3,13,15].



Şekil 1. Lu-177'nin üretim yolları

¹⁷⁷Lu ile İşaretli Moleküler Taşıyıcılar

Çok azı klinik kullanıma giren ¹⁷⁷Lu ile işaretli bir dizi ajan, prelinik ortamlarda değerlendirilmiştir.

Monoklonal Antikorlar

Monoklonal antikorlar spesifik radyonüklidlerle işaretlenerek radyonüklidlerin tümör bölgelerine iletmeleri için hedeflenen moleküler araçlar olarak kullanılırlar. Y-90 ve I-131, radyoimmünoterapide çoğu monoklonal antikorun işaretlenmesinde Lu-177'ye göre daha yaygın olarak kullanılan radyonüklidlerdir. ⁹⁰Y'nin 2,7 günlük yarı ömrüne kıyasla ¹⁷⁷Lu'nun daha uzun yarılanma ömrü (6,89 gün), işaretli antikorun üretim lojistiği ve tedavinin planlanması açısından önemli bir avantaj sağlamaktadır. Ek olarak, ¹⁷⁷Lu'nun β^- parçacıklarının düşük enerjisi nedeniyle, kemik iliği toksisitesi de daha düşüktür. Daha uzun yarı ömür doz oranını düşürürken, aynı dozu bir süre daha düşük aktiviteyle sağlar ve aynı zamanda hedeflenmemiş antikorun radyasyon dozunun büyük kısmını, hedef dışı dokulara vermeden önce dolaşımdan elimine edilmesine yardımcı olur. Sonuç olarak, kandaki seviyeler düştükten sonra radyonüklidin büyük bir kısmı bozunur. Lu-177 tarafından yayılan gama ışınları kullanılarak, radyoimmünokonjugatın lokalizasyonunu tespit etmek için sintigrafik görüntüleme gerçekleştirilebilir. Lu-177 ortalama 133 KeV (maksimum 497 KeV) enerjiye sahip β^- parçacıklar yayarak, hedeflediği bir hücreden yaklaşık 12 hücre çapındaki hücrelere de radyasyon dozlarının iletilmesini sağlar. Bu durum yaklaşık 50 hücre çapında maksimum hücre-etkileşim potansiyeli oluşturur. ¹⁷⁷Lu'nun ⁹⁰Y'e göre daha düşük renal toksisitesi, ¹⁷⁷Lu bazlı monoklonal antikorların geliştirilmesine hız kazandıran avantajlı bir özelliktir [33-36].

Şu anda, çeşitli kanser türlerinin immünoterapisi için Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından onaylanmış birkaç monoklonal antikor vardır. Bu ürünler Rituximab (B-hücreli lenfomalar), Trastuzumab (meme kanseri), Alemtuzumab (kronik lenfositik lösemi), Cetuximab (kolorektal, baş ve boyun kanserleri) ve Bevacizumab (kolorektal kanserler)'dir. Radyoimmünoterapi için FDA tarafından onaylanan iki radyoaktif işaretli monoklonal antikor, anti-CD20 antikorlarına (Zevalin: ⁹⁰Y ile işaretli Ibritumomab ve Bexxar: ¹³¹I ile işaretli Tositumomab) dayanmaktadır. Bu ajanların her ikisi de, B hücreli lenfomalı hastalarda tek bir tedaviyi takiben önemli antitümör yanıtı göstermiş ve 3-7 yıl süren % 40-70'in üzerinde tam yanıtla sonuçlanmıştır [33].

Terapötik radyofarmasötiklerin geliştirilmesi için monoklonal antikorların ¹⁷⁷Lu ile radyoişaretlenmesini içeren birkaç çalışma vardır. Bu çalışmaların çoğunda şelatör madde olarak 1,4,7,10-Tetraazasiklododekan-1,4,7,10-tetraasetik asit (DOTA) kullanılmıştır ve ¹⁷⁷Lu'nun antikora bağlanma grubunun ya DOTA çerçevesinin N atomuna (örn., DOTA-NHS ester) ya da DOTA kısmının ana karbosiklik omurgası üzerindeki C atomuna (örn., p-SCN-Bn-DOTA) bağlandığı görülmüştür. Termodinamik stabilite, ayrışma oranları ve serum stabilitesi gibi ligand yapısının ve fiziksel

özelliklerinin, radyoişaretli koordinasyon komplekslerinin *in vivo* ayrışmasının kontrol edilmesinde önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır [3].

Lu-177 ile işaretlemeye kullanılan monoklonal antikorlar şunlardır: Anti CD-20, Anti-L1-CAM, ch81C6, Anti-VEGF, CC-49, Setuksimab, cG250, 7E11, hLL2 (Epratuzumab), huA33, Hu3S193, J-591, MOv18, Pertuzumab, RS7, Trastuzumab, U36 [3].

Peptidler

Neredeyse tüm kanserlerin tümör yüzeyinde spesifik reseptörlerin aşırı ekspresyonuna sahip olması PRRT'nin temelini oluşturmaktadır. PRRT'nin en yaygın kullanılan yöntemi, nöroendokrin tümörlerde aşırı eksprese edilen somatostatin reseptörlerini hedeflemek için somatostatin analoglarının kullanılmasıdır. Diğer örnekler, osteosarkomlar, nöroblastomlar, glioblastomalar, melanomlar, akciğer ve meme karsinomları, küçük hücreli akciğer karsinomu ve medüller tiroid karsinomu için kolesistokinin reseptörleri dahil olmak üzere farklı büyüyen tümör türlerinin yanı sıra neovasküler sistemin aktive edilmiş endotel hücrelerinde bulunan integrin reseptörleri ($\alpha\beta3$), glioma için epidermal büyüme faktörü reseptörleri, prostat ve göğüs kanserleri için gastrin salgılayan peptid/bombesin reseptörleridir. Tümörde aşırı eksprese edilen antijenleri hedefleyen peptidlerin diğer önemli örnekleri arasında bombesin, kolesistokinin/gastrin, glukagon-benzeri peptid-1 (Glucagon-Like Peptide-1, GLP-1)/eksendin ve arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) sayılmaktadır. Bu bağlamda, radyonüklid tedavisi için radyofarmasötikler geliştirmek amacıyla ^{177}Lu ile radyoişaretli çeşitli peptidler elde edilmiştir. Radyonüklid tedavisi için tümör hücrelerini hedeflemek amacıyla ilgi duyulan en önemli peptidler, nöropeptidler olarak da adlandırılan fizyolojik olarak meydana gelen düzenleyici peptidlerdir. Bu peptidlerin büyük çoğunluğu, membrandaki G proteinine bağlı reseptörlere bağlanarak düzenleyici işlevlerine aracılık etmektedir [37-39].

Fullerenler

^{177}Lu 'nun radyoişaretli fullerenlerle potansiyel terapötik olarak kullanımı yakın zamanda Debinski ve ark. tarafından bildirilmiştir. Yapılan çalışmada, beyin tümörü fare modelinde, ^{177}Lu ile işaretli bir metallofullerenin (f-Gd3N@C80) konveksiyon yoluyla arttırılmış intratümöral iletiminin, Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) tarafından, uzun süreli bir metallofulleren tümör retansiyonu ile medyan sağkalımı 21'den 52 güne arttırdığı gösterilmiştir. ^{177}Lu 'nun bir fulleren kafeste enkapsülasyonunun yanı sıra, radyonüklidin en az bir yarı ömür (6,7 gün) boyunca bu kafes içinde tutulduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu ajanın bir interlökin-13 (IL-13) peptidi ile konjugasyonu, glioblastoma multiforme tümörlerinde reseptörleri haritalamak için uygun olduğu bildirilmiştir [40].

Porfirinler

Porfirin türevleri, uygun terapötik radyonüklidlerle işaretlenerek hedeflendirilmiş tümör tedavisi için potansiyel ajanlar olarak kullanılabilen moleküler vektörlerdir. Bu kapsamda suda çözünür

5,10,15,20-tetrakis [4-karboksümetilenoksifenil] porfirin türevi sentezlenerek p-aminobenzil-DOTA ile konjuge edilmiştir. ¹⁷⁷Lu ile işaretlenen konjugat ile fibrosarkom taşıyan farelerde yapılan biyodağılım çalışmalarında önemli tümör/kan ve tümör/kas oranlarına sahip tutulum görülmüştür. Yapılan sintigrafik çalışmalar da bu benzer bulguları doğrulamıştır. Kontrol grubuna kıyasla tedavi edilen hayvanlarda tümör büyümesinde önemli bir gerileme gözlemlenmesi, ¹⁷⁷Lu ile işaretli porfirin türevlerinin hedeflendirilmiş tümör tedavisinde umut vaadedici olduğunu göstermiştir [41,42].

Steroidler

Teşhis ajanları olarak kullanım amacıyla yüksek reseptör afinitesine sahip östrojenlerin Brom-77 (⁷⁷Br), ¹²³I, ¹²⁵I ve ¹⁸⁸Re ile radyoaktif işaretli türevlerinin kullanımı için birçok çalışma bildirilmiştir. ¹⁷⁷Lu ile işaretli estradiol türevinin potansiyel radyoterapötik ajanlar olarak kullanılması nispeten yeni bir çalışmadır. Bir çalışmada, 6 α -amino-17 β -estradiol, bifonksiyonel şelatlayıcı ajan olarak bir C-fonksiyonelleştirilmiş p-tiyosiyanatobenzil DOTA türevi ile birleştirilmesi yoluyla bir steroid konjugatı sentezlenmiştir. Bu çalışma için 17 β -estradiol, 6 α -aminoestradiole dönüştürülmüş ve daha sonra p-tiyosiyanatobenzil-DOTA ile konjuge edilmiştir. ¹⁷⁷Lu ile işaretlenen p-NCS-benzil-DOTA-estradiol konjugatı oda sıcaklığında stabil bulunmuş ve hazırlandıktan sonra 7 gün süreyle radyokimyasal saflığını % 77 oranında korumuştur. Östrojen reseptörlerini aşırı eksprese ettiği bilinen MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı ile yapılan bağlanma çalışmalarında ¹⁷⁷Lu ile işaretli konjugat estradiol reseptörlerine karşı da yüksek özgüllük göstermiştir [43].

Nitroimidazoller

Nitroimidazol türevlerinin hipoksik veya anaerobik bölgelerde birikmesi, bu bileşiklerin, hipoksik dokulara hedeflendirilmiş iyonlaştırıcı radyasyonun öldürücü etkisini artıracak radyosensitize edici maddeler olarak kullanılmasını sağlamaktadır. Tümör hipoksisi, hücreleri kemo ve radyasyon tedavisine karşı dirençli hale getirmekte ve kanser tedavisi için bir zorluk oluşturmaktadır. Yapılan çalışmada, 5-nitroimidazolün bir DOTA konjugatı ¹⁷⁷Lu ile radyoışaretlenmiştir. Bildirilen prosedür p-aminobenzil-DOTA'nın, metronidazolün karboksilik asit türevi olan 2- [N- (2'-metil-5il-nitro) -imidazolil] etanoik asidin uygun şekilde yerleştirilmiş bir amino sübstitüentinin -COOH grubu ile konjugasyonunu içermektedir. ¹⁷⁷Lu ile işaretli konjugatın % 97'ye varan sentez ve işaretleme verimlerine sahip olduğu bulunmuştur [44,45].

İnsan *E. coli* Isıya Dayanıklı Enterotoksini

İnsan *E. coli* ısı kararlı enterotoksin (ST), N1 SSNYCCELCCNPACTGCY19 olarak belirlenmiş 19 aminoasit dizisine sahip olup spesifik olarak normal bağırsak epitel hücrelerinin apikal yüzeyinde ve insan kolorektal kanser hücrelerinin yüzeyinde yüksek yoğunlukta bulunan guanilat siklaz C (GC-C) reseptörüne bağlanmaktadır. Giblin ve ark., DOTA şelatör ajan ile birleştirilmiş ¹⁷⁷Lu işaretli ST analogu ile umut vaadeden sonuçlar bildirmiştir. T84 insan kolon kanseri tümörü ksenograftları taşıyan SCID

farelerinde yürütülen biyodağılım çalışmalarında, ^{177}Lu ile işaretli peptid-DOTA konjugatı, 1 saat p.i.'de idrarda enjekte edilen aktivitenin % 90'ı ile hızlı kan klirensi gösterdiğini bulmuşlardır [46,47].

Lu-177'den Hareketle Hazırlanan Radyofarmasötikler

^{177}Lu -Anti CD20

Ritüksimab, B lenfositlerinde ve B hücreli non-Hodgkin lenfomaların yaklaşık % 90'ında bulunan hidrofilik bir transmembran antijen olan bleomosit antijen CD20'ye seçici olarak bağlanan kimerik bir fare-insan monoklonal antikordur. CD20 antijeni, hücre döngüsü başlatma ve farklılaşmasının aktivasyon sürecindeki erken aşamaları düzenlemektedir. Serbest CD20 antijeni dolaşımdaki kanda tespit edilemez ve antikora bağlandıktan sonra hücre yüzeyinde tutulur. Günümüzde anti CD20 antikoru kullanan iki tescilli radyofarmasötik vardır. Bunlar Zevalin (^{90}Y -Ibritumomab) ve Bexxar'dır (^{131}I -Tositumomab). Bir çalışmada, anti CD20 antikoru (Ritüksimab), antikor molekülü üzerindeki lizin kalıntılarının ϵ -NH₂ grupları ve izotiyosiyanat-benzil-DOTA arasında oluşan tiyoyüre bağları aracılığıyla modifiye edilmiştir. Konjugat, 444 MBq.mg⁻¹ (12 mCi)'lik spesifik aktiviteye sahip ^{177}Lu ile işaretlenmiştir. Çalışmada, pH'ın 9,0'dan 9,5'e ve antikor konsantrasyonunun 10'dan 100 mg.mL⁻¹'ye yükseltilmesi sonucu, antikor molekülü başına birden fazla DOTA molekülü içeren bir konjugat [(DOTA)₄ - Ritüksimab] oluştuğu görülmüştür [48].

Bir çalışmada, nükseden non-Hodgkin lenfomalı iki hastaya ^{177}Lu -DOTA-Ritüksimab uygulanmış ve sonuçlar, ajanın iyi tolere edildiğini göstermiştir. Bu durum, ^{177}Lu -Ritüksimab'ın, nükseden non-Hodgkin lenfoma hastalarında az yan etki ile tedavide iyi bir ajan olabileceğini göstermektedir [3].

^{177}Lu -CC49

Bildirilen ilk ve en kapsamlı olarak ^{177}Lu ile radyoişaretlenen monoklonal antikor, birkaç ana kanserde eksprese edilen, tümör ile ilişkili glikoprotein 72'ye (TAG-72) özgü bir murin monoklonal antikor olan CC-49'dur. TAG-72, gastrointestinal sistem adenokarsinomlarında, yumurtalık ve endometriyal karsinomlarda, küçük hücreli olmayan akciğer adenokarsinomlarında, pankreas karsinomlarında ve meme karsinomlarında eksprese edilmektedir. CC49, ikinci nesil TAG-72'ye özgü bir antikordur ve bildirilen bir yöntemde, ^{177}Lu , p-aminobenzil DOTA ile önceden kompleks haline getirilmiş ve daha sonra tiyofosgen ile aktive edilmiş, ardından CC49 monoklonal antikoru ile konjugasyondan önce ters fazlı kartuş saflaştırması yapılmıştır. Monoklonal antikor ile ^{177}Lu -DOTA konjugasyonu, monoklonal antikorum lizin-NH₂ grubu ile aril izotiyosiyanat grubu aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu bağlamda, subkutan ksenograft tümörlerinde lokalize olan ve hızlı plazma klirensi sergileyen yeni bir insanlaştırılmış anti-TAG-72 monoklonal antikor (HuCC49DeltaCH2) geliştirilmiştir [49].

Başka bir çalışmada ^{177}Lu ile işaretlenmiş murin CC49 monoklonal antikor, Faz I/II klinik deneylerde karın boşluğu ile sınırlı, tekrarlayan TAG-72 pozitif yumurtalık karsinomunun intraperitoneal

tedavisi için kullanılmıştır. Bu çalışmada klinik etkinlik gözlenmiş ve kemik iliği baskılanması nedeniyle tedavi dozları sınırlandırılmıştır. Klinik öncesi çalışmalar, $^{177}\text{Lu-CC49}$ 'un nude farelerde insan kolon adenokarsinom ksenograflarının gerilemesine neden olduğunu göstermiştir. Standart tedavide başarısız olan ve tümörleri TAG-72 antijenine bağlanan gelişmiş adenokarsinomlu hastalara, maksimum tolere edilen ^{177}Lu ile işaretli CC49 dozunu belirlemek için tedavi uygulanmıştır. ^{177}Lu 'nun başlangıç dozu, i.v. 10 mCi.m^{-2} ve CC49 dozu 20 mg'da sabit tutulmuştur. Sonraki 3 hafta boyunca farmakokinetik örnekleme ve immünosintigrafi yapılmıştır. Radyoaktif ^{177}Lu dozu, ardışık her doz seviyesi için 15 mCi.m^{-2} artırılmıştır. İkinci doz seviyesinde 25 mCi.m^{-2} ^{177}Lu ile tedavi edilen hastalarda beklenmedik kemik iliği toksisitesi gelişmiş, iki hastada 4. derece trombositopeni, diğer bir hastada 3. derece trombositopeni gelişmiştir. Bu nedenle $^{177}\text{Lu-CC49}$ 'un tedavi dozlarına sınırlama getirilmiştir [50,51].

$^{177}\text{Lu-J591}$ (PSMA)

Prostat kanseri, erkeklerde görülen başlıca kanserlerden biridir. Bir hücre yüzeyi antijeni olan prostata özgü membran antijeni (Prostate Specific Membrane Antigen, PSMA), 100 kDa'lık bir tip II transmembran glikoproteini olup tüm prostat kanserleri tarafından eksprese edilir. PSMA, N-asetil-L-aspartil-L-glutamatin N-asetil-L-aspartat ve L-glutamata hidrolizini sağlayan bir peptidaz enzimidir. PSMA, normal insan prostat epitelinde düşük seviyelerde eksprese edilirken, hemen hemen tüm prostat kanserlerinde aşırı eksprese edilir. PSMA reseptörü, hem hücre yüzeyine bağlı proteinlerin endositozuna izin verirken hem de PSMA ile işaretli radyoizotopların hücre içinde konsantrasyonunu sağlar. Bu transmembran reseptörünün prostat kanseri hücreleri üzerindeki ekspresyonunun yoğunluğu, prostat kanserini radyonüklidik tedavi için ideal bir hedef haline getirir. PSMA reseptörü, folatın hücre içine alınmasını, hücre çoğalmasını, hücre göçünü ve hücre sağkalımını sağlar. Yüksek dereceli kanserlerde, metastazlarda ve hormona dirençli prostat kanserinde PSMA yoğunluğu artar. Solid tümörler arasında prostat kanseri, radyasyona nispeten duyarlı olduğu ve hedef antijeni dolaşan antikörler için hazır hale getirdiği için genellikle radyoimmünoterapi için uygundur [52-54].

$^{177}\text{Lu-J591}$, kötü huylu prostat kanseri hücrelerine radyasyonu iletebilmek adına ^{177}Lu ile radyoaktif olarak işaretli PSMA'yı hedefleyen hümanize J591 monoklonal antikörüne sahip bir radyofarmasötiktir. Bu ajan ile bildirilen ilk klinik çalışmada, $^{177}\text{Lu-DOTA-MoAb J591}$, jel filtrasyonu ile saflaştırılmış, membran filtrasyonu ile sterilize edilmiş ve soğuk antikör ile kombinasyon halinde hastalara uygulanmıştır. $^{177}\text{Lu-J591}$ kullanan 35 androjenden bağımsız prostat kanser hastası ile bir Faz I klinik deney gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar, hormona dirençli prostat kanserinin tedavisinde $^{177}\text{Lu-J591}$ 'in hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. $^{177}\text{Lu-J591}$ 'in maksimum tolere edilebilir dozu 70 mCi.m^{-2} olarak bulunmuş ve bu doz maksimum tolere edilebilir dozu $17,5 \text{ mCi.m}^{-2}$ olan $^{90}\text{Y-J591}$ 'den önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Yapılan ileri çalışmalarda ise dozun fraksiyonlanmasının daha yüksek terapötik etkinlik sağladığı ve daha düşük miyelotoksisite ile sonuçlandığı bildirilmiştir [55].

¹⁷⁷Lu-DOTATATE ve ¹⁷⁷Lu-DOTATOC

Nöroendokrin tümörlerin (NeuroEndocrine tumor, NET) insidansı dünya çapında her geçen gün artmaktadır. NET'ler, genellikle gastrointestinal ve bronkopulmoner yollarda bulunan çeşitli bir tümör grubudur. Bu tümörler genellikle somatostatin reseptörlerini eksprese eder. Bu nedenle, somatostatin analogları, tedavinin yanı sıra semptomların hafifletilmesi için de kullanılmaktadır. Mevcut birçok terapötik seçenek arasında PRRT'nin oldukça umut verici olduğu gösterilmiştir. Ocak 2018'de FDA, gastroenteropankreatik NET'lerde (GEP-NET'ler) kullanım için ¹⁷⁷Lu-DOTATATE'i onaylamıştır. ¹⁷⁷Lu-DOTATATE mevcut diğer tedavilere kıyasla, ilerlemiş gastroenteropankreatik ve bronşiyal NET'lerde daha iyi sonuçlar göstermiş olup, somatostatin analogları ile kombinasyon halinde, somatostatin reseptörü pozitif ilerlemiş tümörler ve normal böbrek fonksiyonu olan adaylarda GEP-NET tedavisi için kanıtlanmış etkinliğe sahiptir. Bu tedavi, tümör boyutunu küçülttüğü, semptomları iyileştirdiği ve yaşam kalitesini iyileştirdiği için büyük bir potansiyele sahiptir [56,57].

¹⁷⁷Lu-DOTATOC ile PRRT ilk olarak Forrer tarafından tekrarlayan NET'li hastalara uygulanmıştır. Daha sonra yayınlanan bir çalışmada, ¹⁷⁷Lu-DOTATOC'un ⁹⁰Y-DOTATOC'tan daha az miyelotoksik olduğu ve ekstrahepatik hastalık veya soliter metastaz mevcut olduğunda daha uzun bir genel sağkalım sağladığı bildirilmiştir [58,59].

Das ve ark. tarafından 200 mCi (7,4 GBq) ¹⁷⁷Lu-DOTATATE preparatı; 260 µg DOTATATE ve 55 mg gentisik asitin 1,4 mL 0,1 M amonyum asetat tamponunda (pH~5) 25 mCi.g⁻¹ spesifik aktiviteye sahip ¹⁷⁷Lu kullanılarak 45 dakika boyunca 85-90°C'de inkübe edilmesiyle hazırlanmıştır. 10 mCi (370 MBq) aktiviteye sahip serum fizyolojik ile seyreltilen ¹⁷⁷Lu-DOTATATE preparatı, tanı amaçlı görüntüleme için Millipore filtrasyonundan sonra hastalara uygulanırken, radyoterapötik tedavi sağlamak için seyreltilmemiş ¹⁷⁷Lu-DOTATATE preparatı, literatürde bildirilen standart protokolü takiben Millipore filtrasyonundan sonra hastalara uygulanmaktadır [60,61].

Lutathera

PRRT için ilk radyofarmasötik olan Lutathera, somatostatin reseptör (Somatostatin receptor, SSTR) pozitif GEP-NET tedavisi için 2017 yılında Avrupa İlaç Kurumu (European Medicines Agency, EMA) ve 2018 yılında FDA tarafından onaylanmıştır. Lutathera, cerrahi olarak çıkarılmayan, vücudun diğer bölgelerine yayılabilen veya tedaviye yanıt vermeyen GEP-NET'leri tedavi etmek için kullanılır. Lutathera sadece hücre yüzeylerinde reseptörleri olan GEP-NET'ler içindir. GEP-NET'leri olan hastaların sayısı düşük olduğu için, bunlar "nadir" olarak kabul edilmekte olup, Lutathera 31 Ocak 2008'de "yetim ilaç" olarak tanımlanmıştır. Lutathera, aktif madde olarak ¹⁷⁷Lu-oksodotretid içermektedir [62].

¹⁷⁷Lu-EDTMP ve ¹⁷⁷Lu-DOTMP

Lu-177, iskelet metastazlarından kaynaklanan kemik ağrısını hafifletici ajanların gelişimi için uygun özelliklere sahiptir. ¹⁷⁷Lu'dan yayılan β- partikül enerjileri yeterince düşüktür ve bu nedenle doku

penetrasyon aralığı, kemik ağrısı palyasyonu için halihazırda kullanılan radyonüklitler olan Stronsiyum-89 (Sr-89), Fosfor-32 (P-32), ¹⁸⁸Re ve Samaryum-153 (Sm-153) için beta emisyon enerjilerinden önemli ölçüde daha düşüktür [3].

Metastatik iskelet lezyonlarına bağlı kemik ağrısının palyatif bakımı için uygun radyoışaretlenmiş ajanların tasarlanmasında, multidentat poliaminofosfonik asitlerin, yüksek kemik benzeşimleri, iskelet lezyonlarında seçici lokalizasyon ve özellikle lantanidler ile yüksek *in vivo* stabiliteye sahip metal şelatları oluşturma yeteneği nedeniyle taşıyıcı ligandlar olarak en umut verici adaylar olduğu bulunmuştur. Etilendiaminetetrametilen fosfonik asit (EDTMP), başta lantanidler olmak üzere çeşitli radyometallerle stabil kompleksler oluşturan ve tüm komplekslerde biyolojik sistemlerde yüksek kemik afinitesi ve diğer uygun farmakolojik özellikler gösteren en yaygın kullanılan ligandlardan biridir. EDTMP'nin makrosiklik analogu, 1,4,7,10-tetraazasiklododekan-1,4,7,10-tetrametilen fosfonik asit (DOTMP), yine başka bir tetrametilen fosfonik asit olan radyolantanidler kullanılarak kemik ağrısı hafifletme ajanlarının geliştirilmesinde başka bir etkili taşıyıcı ligand olarak kullanılabilir [63].

Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı (International Atomic Energy Agency, IAEA) tarafından, ¹⁷⁷Lu-EDTMP'nin "Metastatik prostat kanserinde kemik ağrısının palyasyonu için ¹⁷⁷Lu-EDTMP'nin biyolojik güvenlik ve klinik etkinliğinin değerlendirilmesi" başlıklı araştırma projesi desteklenmiştir. Ön değerlendirmede, ¹⁷⁷Lu ile işaretlenmiş hem EDTMP hem de DOTMP olumlu biyodağılım özellikleri gösterirken, EDTMP için toksikolojik veriler zaten ¹⁵³Sm-EDTMP kullanımıyla bağlantılı olarak iyi kurulmuş olduğundan klinik değerlendirme için ¹⁷⁷Lu-EDTMP seçilmiştir [63].

¹⁷⁷Lu-oksin (8-hidroksikinolin)

Lipiodol, haşhaş tohumu yağının iyotlu ve esterleştirilmiş bir lipididir. İlk olarak X-ışını kontrast maddesi olarak kullanılan Lipiodol, yüksek viskozitesi ve lipofilitesi nedeniyle günümüzde transarteriyel embolizasyon için kullanılmaktadır. ¹³¹I, ¹⁸⁸Re ve ⁹⁰Y gibi uygun β yayan radyonüklidlerle işaretlenmiş lipiodol, hem hayvan modellerinde hem de insan deneylerinde karaciğer kanserini hedeflemek için değerlendirilmiştir. Bir çalışmada, ¹⁷⁷Lu-lipiodol, ¹⁷⁷Lu-oksin (8-hidroksikinolin) kompleksinin hazırlanmasını ve ardından lipiodol ortamında dağıtılmasını içeren iki aşamalı bir işlemle hazırlanmıştır. ¹⁷⁷Lu-oksin kompleksi, yüksek verimle (% 98) hazırlanmış ve ¹⁷⁷Lu aktivitesinin % 95'i, optimize reaksiyon koşulları altında lipiodol içinde dağıtılabilmektedir. Radyoışaretili preparatın insan serumunda iyi *in vitro* stabilite sergilediği bulunmuştur. Biyolojik davranış, sağlıklı ve karaciğer kanseri taşıyan Wistar sıçanlarında hem *in vitro* hücre bağlanma çalışmaları ile hem de biyodağılım ve sintigrafik görüntülemeyi içeren *in vivo* hayvan çalışmaları ile incelenmiştir. *In vitro* hücre alım çalışmaları, hem normal hem de kanserli karaciğer hücrelerinde yüksek bir alım olduğunu ortaya koymuştur. ¹⁷⁷Lu-oksin, karaciğerde yüksek derecede başlangıç lokalizasyonu göstermiştir. Bununla birlikte, daha sonra radyoaktivite sızıntısı ve kemikte ¹⁷⁷Lu tutulumunun, ajanın potansiyelini sınırladığı ve karaciğer kanseri tedavisi için daha az uygun bir radyofarmasötik olduğu görülmüştür [64-66].

¹⁷⁷Lu-Hidroksiapatit

Hidroksiapatit (HA), kemik matrisinin doğal mineral bileşenidir. HA biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir. Radyonüklidlerle kolayca işaretlenebilir. Biyolojik ajan olarak yarı ömrü üzerinde çalışılan radyonüklidlere göre daha uzundur. HA partikülleri, doğal metabolik süreçlerle Ca⁺² ve PO₄⁻³ iyonlarına dönüştürülür ve 6 haftalık bir süre içinde elimine edilerek biyouyumluluk sağlar [3,14,67].

¹⁷⁷Lu-HA, inflamatuvar romatoid artrit tedavisi ve primer ve metastatik karaciğer kanseri tedavisi gibi radyofarmasötik uygulamalarında kullanılmak üzere araştırılmıştır. Bu iki uygulama, farklı boyut aralıklarında HA parçacıklarının kullanılmasını gerektirmektedir. HA, radyoterapi uygulamaları için tercih edilen partiküllerden biridir ve istenilen partikül boyutu ile kolaylıkla sentezlenebilir [68].

Bir çalışmada, ¹⁷⁷Lu ile işaretlenmiş 20-60 µm boyutundaki partiküller, karaciğer hücreli kanserinde potansiyel bir radyoterapötik ajan olarak değerlendirilmiştir. ¹⁷⁷Lu-HA, optimize edilmiş reaksiyon koşulları altında % 99'luk yüksek bir radyokimyasal saflıkta hazırlanmış ve radyoışaretli ajan, *in vitro* olarak yeterli stabilite göstermiştir. ¹⁷⁷Lu-HA partiküllerinin biyolojik davranışı, normal Wistar sıçanlarında, preparatın doğrudan hepatik arter yoluyla enjekte edilmesiyle hem biyolojik dağılım hem de sintigrafik görüntüleme ile incelenmiş ve başlangıçta biriken aktivitenin karaciğerden yavaş salındığı gözlenmiştir. ¹⁷⁷Lu⁺³'ün olası salımını gösteren, aktivitenin kademeli olarak arttığı bulunan iskelet haricinde major organların/dokunun hiçbirinde kayda değer bir tutulum gözlenmemiştir [3,14,68].

Romatoid artrit tedavisi için radyosinevektomi, 2–10 µm boyut aralığında kolloid veya radyoışaretli partiküller olarak lokal eklem içi enjeksiyonla uygulanan β- yayan radyonüklidleri kullanan bir radyoterapötik yöntemdir. Orta enerjili β- parçacıklarının emisyonu ve diğer uygun bozunma özellikleri, ¹⁷⁷Lu'yu küçük ve orta büyüklükteki eklemlerin radyasyon sinovektomisinde kullanımı için umut verici bir radyonüklid yapmaktadır. Bir çalışmada, ¹⁷⁷Lu-HA partikülleri, hem serum fizyolojik hem de insan serumunda 37°C'de iyi *in vitro* stabilite gösteren yüksek radyokimyasal saflıkta (~%99) hazırlanmıştır. Wistar sıçanlarının hem normal hem de artritlenmiş diz eklemlerine ¹⁷⁷Lu-HA partiküllerinin eklem içi enjeksiyonundan sonra seri sintigrafik görüntülerin kaydedilmesiyle test edilen radyoışaretli preparatın biyolojik etkinliği, sinovyal boşluk içindeki aktivitenin 7 günlük bir çalışma süresi boyunca eklemden sızarak tam olarak tutulmasını göstermiştir. Çalışmalar, küçük eklemlerin radyosinevektomisi için kullanılan Erbiyum-169 (Er-169) bazlı kolloidlere alternatif olarak ¹⁷⁷Lu-HA'nın kullanım potansiyelini göstermiştir. Fakat, ¹⁷⁷Lu-HA, radyokimyasal çalışmalarda umut verici özellikler sergilemesine rağmen, ön biyo-değerlendirme çalışmalarında görülen suboptimal karaciğer retansiyonu ve istenmeyen iskelet tutulumu nedeniyle insan uygulamalarında uygun olarak görülmemektedir [68-70].

¹⁷⁷Lu'nun Teranostik Potansiyeli

¹⁷⁷Lu'nun gama fotonlarının [E_γ = 113 ve 208 KeV] düşük bolluktaki emisyonu, ¹⁷⁷Lu'nun görüntüleme çalışmalarında kullanılmasını sağlayarak ¹⁷⁷Lu'yu teranostik bir ajan yapar. İlk lokalizasyonu belirlemek ve tedavi öncesi görüntüleme yapmak ¹⁷⁷Lu kullanılmasıyla mümkün olmaktadır. ¹⁷⁷Lu bazlı radyofarmasötüğün sadece izleyici seviyelerinin (yani subterapötik aktivite) uygulanmasıyla, hastalarda klinik öncesi dozimetrik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu durum, bir ilacın uygun dozunun güvenlik ve etkililik açısından uygulanabildiği "kişiselleştirilmiş tıbbın" temelini oluşturmaktadır [26,28].

BPAMD (4-[[bis(fosfonometil)-karbamoil]metil]-7,10-bis(karboksümetil)-1,4,7,10-(tetraaza-siklo-dodec-1-il)-⁶⁸Ga ile işaretli asetik asit)), osteoblastik kemik metastazlarının teşhisi için ilk olarak insan *in vivo* çalışmasında kullanılmıştır. DOTA bazlı bifosfonat ligandı BPAMD, ¹⁷⁷Lu gibi üç değerlikli metalik lantanit terapötik radyonüklidlerle kompleks oluşturmak için uygun bir ligandır. Aynı ligand bu nedenle tanı, dozimetri hesaplaması, tedavi ve PET/BT aracılığıyla tedavinin kontrolü için de kullanılabilir [71,72].

Bir çalışmada, ¹⁷⁷Lu'nun terapötik potansiyeli, metastatik NET'li hastalarda gösterilmiştir. 39 hastaya tanısal tarama için 10 mCi dozunda ¹⁷⁷Lu-DOTATATE enjekte edilmiştir. Hastaların 4, 24 ve 48. saatlerde tüm vücut düzlemsel görüntüleri ve SPECT/BT görüntüleri alınmıştır. Tedavi öncesi taramalar ayrıca dozimetrik hesaplamalar için kullanılmıştır. SPECT/BT ile tüm vücut ¹⁷⁷Lu-DOTATATE taraması, hastanın kontrast BT taramasında gözlemlendiği gibi tüm lezyonlarda normal fizyolojik dağılım ve anormal tutulum göstermiştir. SPECT/BT görüntüleri, reseptör alımının heterojen ve homojen dağılımını göstermiş ve ayrıca tümör hacminin tahmin edilmesine yardımcı olmuştur [73].

Bir başka çalışmada, aynı hastada gerçekleştirilen karşılaştırmalı görüntüleme çalışmalarında, ¹⁷⁷Lu-DOTATATE SPECT/BT'nin hem duyarlılık hem de lezyon özellikleri açısından ¹¹¹In-DOTATATE SPECT/BT ve ⁶⁸Ga-DOTATOC PET/BT taramalarına göre daha iyi olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma, kontrast BT'de görülen tüm metastatik lezyonları göstermiştir. Tedavi öncesi ¹⁷⁷Lu-DOTATATE dozimetrisi ile tüm vücut tanısal taramaları tedavileri daha doğru bir şekilde uygulama fırsatı sunmaktadır [73].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Lu-177 nükleer tıpta geç kullanılmaya başlanan bir radyonüklid olmasına rağmen yapılan klinik çalışmalarda etkinliğiyle umut verici bir radyonüklid olarak görülmüş ve dolayısıyla büyük bir önem kazanmıştır. Olumlu nükleer karakteristiği, yüksek aktivite seviyelerine kolay ulaşabilmesi ve yüksek spesifik aktivite göstermesi nükleer tıpta kullanılmasının başlıca faktörleridir. 6,7 günlük nispeten uzun sayılabilir yarı ömrü sayesinde, nükleer tıp alanında gelişmemiş ülkelere de ulaştırılabilmektedir. Yaydığı gama fotonlar sayesinde tanıda ve yaydığı beta fotonlar sayesinde ise tedavide kullanılabilen

teranostik bir ajandır. Klinikte birçok kullanım alanı gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, ^{177}Lu -DOTATATE ve diğer DOTA türevlerinin NET'lerin tedavisinde, ^{177}Lu -PSMA'nın prostat kanseri tedavisinde, ^{177}Lu -Anti-CD20'nin Non-Hodgkin Lenfomaların tedavisinde, ^{177}Lu -CC49'un adenokarsinomların tedavisinde, ^{177}Lu -EDTMP/DOTMP'nin kemik ağrısını hafifletmede ve ^{177}Lu -HA ile ^{177}Lu -oksin'in karaciğer kanserinde kullanılabilirliği araştırılmış ve sonuçlar ^{177}Lu 'nun kanser tedavisinde çok büyük bir potansiyel gösterdiği bulunmuştur.

TEŞEKKÜR

Bu makale Dorukhan HİŞİR tarafından Arş. Gör. Dr. Meliha EKİNCİ danışmanlığında tamamlanan "Lutesyum-177 ile Hazırlanan Radyofarmasötikler" başlıklı lisans bitirme projesinden hareketle hazırlanmıştır.

YAZAR KATKILARI

Kavram: M.E., D.İ.Ö.; Tasarım: M.E., D.İ.Ö.; Denetim: M.E., D.İ.Ö.; Kaynaklar: D.H., M.E., D.İ.Ö.; Malzemeler: D.H., M.E., D.İ.Ö.; Veri Toplama ve/veya işleme: D.H., M.E.; Analiz ve/veya yorumlama: D.H., M.E., D.İ.Ö.; Literatür taraması: D.H., M.E.; Makalenin yazılması: D.H., M.E.; Kritik inceleme: M.E., D.İ.Ö.; Diğer: D.H., M.E., D.İ.Ö.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

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

KAYNAKLAR

1. Sivri, N.N. (2004). Radyonüklidik tedavi. *Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi*, 9–10, 11–17.
2. Ekinci, M., İlem-Özdemir, D. (2021). Radyofarmasötikler ve teranostikler. *Journal of Literature Pharmacy Sciences*, 10(1), 119–132. [CrossRef]
3. Banerjee, S., Pillai, M.R.A., Knapp, F.F. (2015). Lutetium-177 therapeutic radiopharmaceuticals: Linking chemistry, radiochemistry, and practical applications. *Chemical Reviews*, 115(8), 2934–2974. [CrossRef]
4. Riondato, M., Eckelman, W.C. (2016). Radiopharmaceuticals. In: A. Ciarmiello, L. Mansi (Eds.). PET-CT and PET-MRI in Neurology: SWOT Analysis Applied to Hybrid Imaging (pp. 31–57). Springer International Publishing. [CrossRef]

5. Ekinci, M., İlem-Özdemir, D. (2021). İyonlaştırıcı radyasyon ve onkolitik virüsler ile kombine tedavinin etkileri. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(1), 79–92.
6. Ekinci, M., İlem-Özdemir, D. (2021). Nanoteranostikler. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 45(1), 131-155 [CrossRef]
7. Nurili, F., Vural, G.U., Aras, Ö. (2015). Molecular imaging methods in theranostic platform. *Nuclear Medicine Seminars*, 2, 120–127.
8. Ersahin, D., Doddamane, I., Cheng, D. (2011). Targeted radionuclide therapy. *Cancers*, 3(4), 3838–3855. [CrossRef]
9. Zukotynski, K., Jadvar, H., Capala, J., Fahey, F. (2016). Targeted radionuclide therapy: Practical applications and prospects. *Biomarkers in Cancer*, 8s2(8), BIC.S31804. [CrossRef]
10. Goldsmith, S.J. (2020). Targeted radionuclide therapy: A historical and personal review. *Seminars in Nuclear Medicine*, 50(1), 87–97. [CrossRef]
11. Jurcic, J.G., Wong, J.Y.C., Knox, S.J., Wahl, D.R., Rosenblat, T.L., Meredith, R.F. (2016). Targeted radionuclide therapy. In: L.L. Gunderson, J.E. Tepper (Eds.). *Clinical Radiation Oncology (Fourth Edition)* (pp. 399-418.e14). Elsevier. [CrossRef]
12. Dash, A., Chakraborty, S., Pillai, M.R.A., Knapp, F.F.R. (2015). Peptide receptor radionuclide therapy: An overview. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 30(2), 47–71. [CrossRef]
13. Dash, A., Pillai, M.R.A., Knapp, F.F. (2015). Production of ¹⁷⁷Lu for targeted radionuclide therapy: Available options. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 49(2), 85–107. [CrossRef]
14. Das, T., Banerjee, S. (2015). Theranostic applications of Lutetium-177 in radionuclide therapy. *Current Radiopharmaceuticals*, 9(1), 94–101. [CrossRef]
15. Kuznetsov, R.A., Bobrovskaya, K.S., Svetukhin, V.V., Fomin, A.N., Zhukov, A.V. (2019). Production of lutetium-177: Process aspects. *Radiochemistry*, 61(4), 381–395. [CrossRef]
16. Ocak, M. (2015). Radiopharmaceuticals for PET. *Toraks Cerrahisi Bulteni*, 6(2), 154–160. [CrossRef]
17. Ercan, M.T. (1996). Nükleer tıp uygulamaları. *Posyon*, 5, 17–21.
18. Wadsak, W., Mitterhauser, M. (2010). Basics and principles of radiopharmaceuticals for PET/CT. *European Journal of Radiology*, 73(3), 461–469. [CrossRef]
19. Karayel, E. (2018). Yüksek Lisans tezi. ^{99m}Tc-HMPAO ile işaretli lökosit sintigrafisinde kullanılan ^{99m}Tc-HMPAO-lökosit radyofarmasötüğünün; mikrobiyolojik, radyokimyasal ve biyokimyasal açıdan kalite kontrollerinin değerlendirilmesi. Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
20. Ocak, M. (2005). Yüksek Lisans tezi. Mikropartiküllerin radyonüklit ile işaretlenmesi ve optimizasyonu. Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
21. Unak, P. (2002). Targeted tumor radiotherapy. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45(spe), 97–110. [CrossRef]

22. Kramer-Marek, G., Capala, J. (2012). The role of nuclear medicine in modern therapy of cancer. *Tumor Biology*, 33(3), 629–640. [[CrossRef](#)]
23. Volkert, W.A., Huffman, T.J. (1999). Therapeutic radiopharmaceuticals. *Chemical Reviews*, 99(9), 2269–2292. [[CrossRef](#)]
24. Yeong, C.H., Cheng, M., Ng, K.H. (2014). Therapeutic radionuclides in nuclear medicine: Current and prospects. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 15(10), 845–863. [[CrossRef](#)]
25. Alberti, C. (2012). From molecular imaging in preclinical/clinical oncology to theranostic applications in targeted tumor therapy. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 16(14), 1925–1933.
26. Denardo, G.L., Denardo, S.J. (2012). Concepts, consequences, and implications of theranosis. *Seminars in Nuclear Medicine*, 42(3), 147–150. [[CrossRef](#)]
27. Kelkar, S.S., Reineke, T.M. (2011). Theranostics: Combining imaging and therapy. *Bioconjugate Chemistry*, 22(10), 1879–1903. [[CrossRef](#)]
28. Srivastava, S.C. (2012). Paving the way to personalized medicine: Production of some promising theragnostic radionuclides at Brookhaven National Laboratory. *Seminars in Nuclear Medicine*, 42(3), 151–163. [[CrossRef](#)]
29. Patnaik, P. (2003). Handbook of inorganic chemicals. *Choice Reviews Online*, 40(11), 40-6428-40-6428. [[CrossRef](#)]
30. Bracken, J.D. (1999). The History and Use of Our Earth's Chemical Elements: A Reference Guide (Krebs, Robert E.). *Journal of Chemical Education*, 76(4), 475-475. [[CrossRef](#)]
31. Audi, G., Bersillon, O., Blachot, J., Wapstra, A.H. (2003). The NUBASE evaluation of nuclear and decay properties. *Nuclear Physics A*, 729(1), 3–128. [[CrossRef](#)]
32. Pillai, A., (Russ) Knapp, F. (2015). Evolving important role of Lutetium-177 for therapeutic nuclear medicine. *Current Radiopharmaceuticals*, 8(2), 78–85. [[CrossRef](#)]
33. Goldenberg, D.M. (2002). Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies. *Journal of Nuclear Medicine*, 43(5), 693–713.
34. Köhler, G., Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495–497. [[CrossRef](#)]
35. Schlom, J. (1986). Basic principles and applications of monoclonal antibodies in the management of carcinomas: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Research*, 46(7), 3225–3238.
36. Strebhardt, K., Ullrich, A. (2008). Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 Years of progress. *Nature Reviews Cancer*, 8(6), 473–480. [[CrossRef](#)]
37. Fani, M., Maecke, H.R., Okarvi, S.M. (2012). Radiolabeled peptides: Valuable tools for the detection and treatment of cancer. *Theranostics*, 2(5), 481–501. [[CrossRef](#)]

38. Fani, M, Maecke, H.R. (2012). Radiopharmaceutical development of radiolabelled peptides. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 39(Suppl 1), S11-30. [\[CrossRef\]](#)
39. Reubi, J.C. (2003). Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocrine Reviews*, 24(4), 389–427. [\[CrossRef\]](#)
40. Debinski, W., Gibo, D.M., Hulet, S.W., Connor, J.R., Gillespie, G.Y. (1999). Receptor for interleukin 13 is a marker and therapeutic target for human high-grade gliomas. *Clinical Cancer Research*, 5(5), 985–990.
41. D. Sarma, H., Das, T., Banerjee, S., Venkatesh, M., B. Vidyasagar, P., P. Mishra, K. (2011). Studies on efficacy of a novel ¹⁷⁷Lu-labeled porphyrin derivative in regression of tumors in mouse model. *Current Radiopharmaceuticals*, 4(2), 150–160. [\[CrossRef\]](#)
42. Das, T., Chakraborty, S., Sarma, H.D., Banerjee, S., Venakatesh, M. (2010). A novel ¹⁷⁷Lu-labeled porphyrin for possible use in targeted tumor therapy. *Nuclear Medicine and Biology*, 37(5), 655–663. [\[CrossRef\]](#)
43. Banerjee, S., Das, T., Chakraborty, S., Samuel, G., Korde, A., Venkatesh, M., Pillai, M.R.A. (2005). An estradiol-conjugate for radiolabelling with ¹⁷⁷Lu: An attempt to prepare a radiotherapeutic agent. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13(13), 4315–4322. [\[CrossRef\]](#)
44. Das, T., Chakraborty, S., Banerjee, S., Mukherjee, A., Samuel, G., Sarma, H.D., Nair, C.K.K., Kagiya, V.T., Venkatesh, M. (2004). Preparation and preliminary biological evaluation of a ¹⁷⁷Lu labeled sanazole derivative for possible use in targeting tumor hypoxia. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12(23), 6077–6084. [\[CrossRef\]](#)
45. Das, T., Chakraborty, S., Banerjee, S., Sarma, H.D., Samuel, G., Venkatesh, M. (2006). Preparation and preliminary biological evaluation of a ¹⁷⁷Lu labeled nitroimidazole derivative for possible use in targeted tumor therapy. *Radiochimica Acta*, 94(6–7), 375–380. [\[CrossRef\]](#)
46. Guarino, A., Cohen, M., Thompson, M., Dharmasathaphorn, K., Giannella, R. (1987). T84 cell receptor binding and guanyl cyclase activation by Escherichia coli heat-stable toxin. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 253(6 (16/6)), G775–G780. [\[CrossRef\]](#)
47. Gali, H., Sieckman, G.L., Hoffman, T.J., Owen, N.K., Chin, D.T., Forte, L.R., Volkert, W.A. (2001). *In vivo* evaluation of an ¹¹¹In-labeled ST-peptide analog for specific-targeting of human colon cancers. *Nuclear Medicine and Biology*, 28(8), 903–909. [\[CrossRef\]](#)
48. Forrer, F., Chen, J., Fani, M., Powell, P., Lohri, A., Müller-Brand, J., Moldenhauer, G., Maecke, H.R. (2009). *In vitro* characterization of ¹⁷⁷Lu-radiolabelled chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and a preliminary dosimetry study. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 36(9), 1443–1452. [\[CrossRef\]](#)
49. Schlom, J., Siler, K., Milenic, D.E., Eggensperger, D., Colcher, D., Miller, L.S., Houchens, D., Cheng, R., Kaplan, D., Goeckeler, W. (1991). Monoclonal antibody-based therapy of a human tumor xenograft with a ¹⁷⁷Lutetium-labeled immunoconjugate. *Cancer Research*, 51, 2889–2896.
50. Mulligan, T., Carrasquillo, J.A., Chung, Y., Milenic, D.E., Schlom, J., Feuerstein, I., Paik, C., Perentesis, P., Reynolds, J., Curt, G. (1995). Phase I study of intravenous Lu-labeled CC49 murine monoclonal antibody in patients with advanced adenocarcinoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 1(12), 1447–1454.

51. Houchens, D., Houchens, D., Cheng, R., Kaplan, D., Goeckeler, W. (1991). Monoclonal antibody-based therapy of a human tumor xenograft with a ¹⁷⁷Lutetium-labeled immunoconjugate. *Cancer Research*, 51, 2889–2896.
52. Emmett, L., Willowson, K., Violet, J., Shin, J., Blanksby, A., Lee, J. (2017). Lutetium 177 PSMA radionuclide therapy for men with prostate cancer: a review of the current literature and discussion of practical aspects of therapy. *Journal of Medical Radiation Sciences*, 64(1), 52–60. [\[CrossRef\]](#)
53. Mhaweche-Fauceglia, P., Zhang, S., Terracciano, L., Sauter, G., Chadhuri, A., Herrmann, F.R., Penetrante, R. (2007). Prostate-specific membrane antigen (PSMA) protein expression in normal and neoplastic tissues and its sensitivity and specificity in prostate adenocarcinoma: An immunohistochemical study using multiple tumour tissue microarray technique. *Histopathology*, 50(4), 472–483. [\[CrossRef\]](#)
54. Yadav, M.P., Ballal, S., Sahoo, R.K., Dwivedi, S.N., Bal, C. (2019). Radioligand therapy with ¹⁷⁷Lu-PSMA for metastatic castration-resistant prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Roentgenology*, 213(2), 275–285. [\[CrossRef\]](#)
55. Vallabhajosula, S., Goldsmith, S.J., Hamacher, K.A., Kostakoglu, L., Konishi, S., Milowski, M.I., Nanus, D.M., Bander, N.H. (2005). Prediction of myelotoxicity based on bone marrow radiation-absorbed dose: Radioimmunotherapy studies using ⁹⁰Y- and ¹⁷⁷Lu-labeled J591 antibodies specific for prostate-specific membrane antigen. *Journal of Nuclear Medicine*, 46(5), 850–858.
56. Knapp, F.F.R., Dash, A. (2017). Radiopharmaceuticals for therapy. *The Journal of Nuclear Medicine*, 58(9), 1526. [\[CrossRef\]](#)
57. Maqsood, M.H., Tameez Ud Din, A., Khan, A.H. (2019). Neuroendocrine tumor therapy with Lutetium-177: A literature review. *Cureus*, 11(1), e3986. [\[CrossRef\]](#)
58. Frilling, A., Weber, F., Saner, F., Bockisch, A., Hofmann, M., Mueller-Brand, J., Broelsch, C.E. (2006). Treatment with ⁹⁰Y- and ¹⁷⁷Lu-DOTATOC in patients with metastatic neuroendocrine tumors. *Surgery*, 140(6), 968–977. [\[CrossRef\]](#)
59. Baum, R.P., Kluge, A.W., Kulkarni, H., Schorr-Neufing, U., Niepsch, K., Bitterlich, N., van Echteld, C.J.A. (2016). [¹⁷⁷Lu-DOTA]0-D-Phe1-Tyr3-Octreotide (¹⁷⁷Lu-DOTA TOC) for peptide receptor radiotherapy in patients with advanced neuroendocrine tumours: A Phase-II study. *Theranostics*, 6(4), 501–510. [\[CrossRef\]](#)
60. Danthala, M., Kallur, K.G., Prashant, G.R., Rajkumar, K., Raghavendra Rao, M. (2014). ¹⁷⁷Lu-DOTATATE therapy in patients with neuroendocrine tumours: 5 Years' experience from a tertiary cancer care centre in India. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 41(7), 1319–1326. [\[CrossRef\]](#)
61. Das, T., Banerjee, S., Shinto, A., Kamaleshwaran, K.K., Sarma, H.D. (2014). Preparation of therapeutic dose of ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE using a novel single vial freeze-dried kit: A comparison with 'in-situ' preparation at hospital radiopharmacy. *Current Radiopharmaceuticals*, 7(1), 12–19. [\[CrossRef\]](#)
62. Hennrich, U., Kopka, K. (2019). Lutathera®: The first FDA-and EMA-approved radiopharmaceutical for peptide receptor radionuclide therapy. *Pharmaceuticals*, 12(3), 114. [\[CrossRef\]](#)

63. Chakraborty, S., Das, T., Sarma, H.D., Venkatesh, M., Banerjee, S. (2008). Comparative studies of ^{177}Lu -EDTMP and ^{177}Lu -DOTMP as potential agents for palliative radiotherapy of bone metastasis. *Applied Radiation and Isotopes*, 66(9), 1196–1205. [\[CrossRef\]](#)
64. Dalla Palma, L. (1998). Diagnostic imaging and interventional therapy of hepatocellular carcinoma. *British Journal of Radiology*, 71, 808–818. [\[CrossRef\]](#)
65. Subramanian, S., Das, T., Chakraborty, S., Sarma, H.D., Banerjee, S., Samuel, G., Venkatesh, M. (2010). Preparation of ^{177}Lu -labeled oxine in lipiodol as a possible agent for therapy of hepatocellular carcinoma: A preliminary animal study. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 25(5), 539–543. [\[CrossRef\]](#)
66. Wang, S.J., Lin, W.Y., Chen, M.N., Shen, L.H., Tsai, Z.T., Tinge, G. (1995). Preparation and biodistribution of yttrium-90 Lipiodol in rats following hepatic arterial injection. *European Journal of Nuclear Medicine*, 22(3), 233–236. [\[CrossRef\]](#)
67. Unni, P.R., Chaudhari, P.R., Venkatesh, M., Ramamoorthy, N., Pillai, M.R.A. (2002). Preparation and bioevaluation of ^{166}Ho labelled hydroxyapatite (HA) particles for radiosynovectomy. *Nuclear Medicine and Biology*, 29(2), 199–209. [\[CrossRef\]](#)
68. Chakraborty, S., Das, T., Sarma, H.D., Venkatesh, M., Banerjee, S. (2008). Preparation and preliminary studies on ^{177}Lu -labeled hydroxyapatite particles for possible use in the therapy of liver cancer. *Nuclear Medicine and Biology*, 35(5), 589–597. [\[CrossRef\]](#)
69. Davis, M.A., Chinol, M. (1989). Radiopharmaceuticals for radiation synovectomy: Evaluation of two yttrium-90 particulate agents. *Journal of Nuclear Medicine*, 30(6), 1047–1055.
70. Schneider, P., Farahati, J., Reiners, C. (2005). Radiosynovectomy in rheumatology, orthopedics, and hemophilia. *Journal of Nuclear Medicine*, 46(1 suppl), 48S-54S.
71. Fellner, M., Biesalski, B., Bausbacher, N., Kubíček, V., Hermann, P., Rösch, F., Thews, O. (2012). ^{68}Ga -BPAMD: PET-imaging of bone metastases with a generator-based positron emitter. *Nuclear Medicine and Biology*, 39(7), 993–999. [\[CrossRef\]](#)
72. Baum, R.P., Kulkarni, H.R. (2012). Theranostics: From molecular imaging using Ga-68 labeled tracers and PET/CT to personalized radionuclide therapy - the bad berka experience. *Theranostics*, 2(5), 437–447. [\[CrossRef\]](#)
73. Singh, N., Krishna, B.A., Vyas, M., Venkatesh, M., Banerjee, S., Das, T., Vimal Nair, K.V., Sudipta. (2011). Lutetium DOTATATE whole body scans: A novel approach for evaluation of neuroendocrine tumors. *Indian Journal of Nuclear Medicine*, 26(3), 135-138. [\[CrossRef\]](#)



SAĞLIK KURUMLARINA YAPILAN GERİ ÖDEME YÖNTEMLERİNİN SAĞLIK EKONOMİSİ PERSPEKTİFİNDEN İNCELENMESİ

*THE REVIEW OF METHODS OF REIMBURSEMENT TO HEALTH INSTITUTIONS FROM
THE POINT OF HEALTH ECONOMICS*

Mustafa BUĞDAYCI¹ , Leyla YUMRUKAYA^{2*} , Selen YEĞENOĞLU² 

¹ Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yaşlı Sağlığı Ana Bilim Dalı, 48000,
Muğla, Türkiye

²Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık İşletmeciliği Ana Bilim Dalı, 06100, Ankara,
Türkiye

ÖZ

Amaç: Sağlık sektörüne ayrılmış olan kaynakların etkin bir şekilde kullanılmasını ve bu hizmetlerin topluma en iyi şekilde nasıl bölüştürülebileceğini araştıran sağlık ekonomisi, sağlık politikalarının belirlenmesinde en önemli noktalardan biri haline gelmiştir. Bu çalışmada sağlık ekonomisi alanında önemli bir yer tutan geri ödeme sistemlerinin hem ekonomik hem de sağlık hizmet kalitesi açısından incelenmesi amaçlanmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Sağlık hizmetlerinin dağıtımı ve sunumunda temel aşamalardan biri hizmetler karşılığında yapılan ödemeler ve bu ödemelerin nasıl yapılacağıdır. Bu anlamda esas olarak Beveridge, Bismarck ve özel sigorta yaklaşımı olmak üzere üç farklı yaklaşımın hakim olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, sağlık hizmetlerinin doğası gereği ödeme tutarları tanı ve tedavi süreçleri tamamlandıktan sonra ortaya çıkmaktadır. Sağlık hizmetlerinde maliyetlerin hesaplanması hususunda ortaya çıkan bu zorluklar çeşitli ödeme yöntemleri ile aşılmaya çalışılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Sağlık ekonomisi, geri ödeme, sağlık politikası, ilaç ekonomisi

ABSTRACT

Objective: Health economics aims to use all the resources allocated to the healthcare sector with the most efficient way and how this service can be distributed to the society in the best way. This discipline has become one of the important topics in the determination of health policies. In this study, we aimed to review the

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Leyla Yumrukaya
e-posta / e-mail: leylayumrukaya@hacettepe.edu.tr, Tel. / Phone: +90 312 305 23 49

reimbursement systems, which have a significant place in the field of health economics, regarding both economics and healthcare service quality.

Result and Discussion: *One of the fundamental steps in the distribution and delivery of healthcare services is the payments made in return for the services and how they will be made. In this context, there are three different approaches: Beveridge, Bismarck and private insurance. However, due to the nature of healthcare services, the payments could be calculated after the completion of diagnosis and treatment processes. The difficulties in calculation of costs are coped with various reimbursement methods.*

Keywords: *Health economics, reimbursement, health policy, pharmacoeconomics*

GİRİŞ

Sınırlı kaynakların sınırsız sayıdaki ihtiyaçların karşılanması adına kaynak dağılımının sağlanabilmesi, ekonomi biliminin tartışma konusu olarak yerini korumaktadır [1]. Sağlık ekonomisi ise; benzer şekilde sağlık sektörü için ayrılan kaynakların (işgücü, ekipman, finansal kaynak vb.) en yüksek düzeyde sağlık hizmeti üretilmesi adına, etkin bir şekilde ne şekilde ve nasıl kullanılacağını araştıran bilim dalıdır. Ekonomi ile paralel olarak, sağlık ekonomisi de sağlık hizmetlerinde kullanılan kaynakların etkin bir biçimde kullanılmasını amaçlamaktadır [2]. Bu kapsamda, sağlık politikalarının belirlenmesinde, son yıllarda sağlık ve ilaç ekonomisi çokça tartışılan ve konuşulan konu başlıklarından biri olmuştur. Bu durumun temelinde ise, ülkelerin bütçelerinden sağlık hizmetlerine ayrılan payın artması ve bu artışın sürdürülebilir olmaması yatmaktadır [3]. Dünyadaki sınırlı kaynaklara erişimin belirli bir nüfus için mümkün olabilmesi tedavi maliyetlerinin de irdelenmesi gereğini ortaya çıkarmaktadır [4]. Bu çalışmanın amacı sağlık ekonomisi alanında önemli bir yer tutan geri ödeme sistemlerini hem ekonomik hem de sağlık hizmet kalitesi açısından incelemektir.

Sağlık Ekonomisi

Kıt kaynakların en verimli şekilde kullanımı ile ilgilenen ekonomi bilimi farklı alt dallara ayrılabilir. Bunlar başlıca makroekonomi, mikroekonomi, pozitif ekonomi ve normatif ekonomi olarak sınıflandırılabilir. Mikroekonomi daha çok tüketici davranışları ve bir malın fiyatının nasıl belirlendiği ile ilgilenir. Bununla birlikte üretim ve maliyet gibi konuları da ele alır. Ancak buna karşın makroekonomi ülke ekonomisi, dünya ekonomisi gibi konuları inceler. Esas olarak büyüme, iş gücü, kamu dengesi, enflasyon, ödemeler dengesi, ihracat gibi konuları ele alır [5]. Pozitif ekonomi yaklaşımında veriler neden sonuç ilişkisi içerisinde sunulur ve elde edilen sonuçlar kesin ve hesaplanabilir. Ancak normatif yaklaşımda bu değerlendirmelerden ziyade farklı bakış açıları ve değer yargıları üzerinden hesaplamalar yapılır. Başka bir anlamda pozitif ekonomi yaklaşımında bir durumun “ne olduğu” açıklanırken, normatif ekonomi yaklaşımında “nasıl olması gerektiği” ele alınır [6]. Sağlık ekonomisinde hem tüketici hem ülkeler açısından değerlendirmeler yapılmakta, bununla birlikte durumların ortaya konması ve değerlendirilmesi sürecinde hem normatif hem de pozitif ekonomi yaklaşımları kullanılmaktadır.

Temel olarak sağlık ekonomisi; ekonominin genel prensiplerinin sağlık alanında da uygulandığı

bir çalışma alanıdır. Sağlık ekonomisinde mikroekonominin talep teorisi, maliyet teorisi gibi araçları kullanılarak sağlık hizmetlerinin ekonomik açıdan değerlendirilmesi amaçlanır. Bu sayede var olan hizmetlerin düzeltilmesi veya sağlık politikaları oluşturulması sağlanabilir [7]. Bu kapsamda; sağlık ekonomisinin tam olarak anlaşılabilmesi ve elde edilen sonuçları doğru şekilde yorumlayabilmek sağlık hizmetleri ile ilgili konuları maliyet ve hizmet kavramlarıyla değerlendirebilmek gerekir. Dünya Sağlık Örgütü, sağlık ekonomisinin ihtiyaç temelli, sürdürülebilir, eşitlikçi ve adil bir sağlık hizmeti sunulması esasına dayanması gerektiğini ifade etmiştir [8].

Sağlık Sistemi ve Sağlık Sistemi Modelleri

Sağlık sistemi amacı sağlığı iyileştirmek olan eylemler üreten tüm kurum, kuruluş ve kaynaklar kapsayan bir sistem olarak tanımlanmaktadır [9]. Sağlık finansmanı ise sağlık sisteminde etkili hizmet kapsamını ve finansal korumayı geliştirerek genel sağlık sigortasına doğru ilerlemeyi mümkün kılan sağlık sistemlerinin temel bir işlevidir [10].

Sağlık sistemleri finansman sistemlerine, ekonomik politikalara ve sağlık hizmetlerinin sağlanma şeklinde göre sınıflara ayrılmaktadır. Literatürde özellikle sosyal sigorta modeli, ulusal sağlık sistemi modeli ve özel sigorta modeli olmak üzere üç model öne çıkmaktadır. Ulusal sağlık sistemi modeli, Beveridge modeli olarak adlandırılır. Bu sistem varlığında, tüm vatandaşlar merkezi yönetimle idare edilen devlet tarafından sağlık sigortası kapsamına alınır. Finansman kaynağı ise genel vergilerdir. Sağlık hizmeti sağlayıcısı ya devletin kendisi ya da devlet tarafından kontrol edilen kurumlardır. Sosyal sigorta modeli ise Bismarck modeli olarak da adlandırılan bir sistemdir. Bu sistemde finansman kaynağı işveren, bireysel ve özel sigorta fonları ile sağlanır. Üretim faktörlerinin özel sektör veya devlet tarafından kontrol edildiği/yönetildiği bu sistem aynı zamanda vergi tabanlı bir sigorta sistemidir. Çalışanların vergilendirmelerinden elde edilen vergiler ulusal sağlık sistemi dışında değerlendirilir. Özel sigorta modeli ise direkt olarak çalışanların yaptığı ödemeler veya bireysel sağlık sigortalarına yapılan ödemelerle karakterizedir. Sağlık hizmetleri özel kuruluşlar tarafından serbest piyasada koşullarında sağlanır [11]. Bu modellerin finansman kaynağı, kapsamı, altyapısı, sağlık personeline yapılan ödemeler, devlet müdahalesi ve planlama şekli açısından karşılaştırılması örnek teşkil eden ülkeler ile birlikte Tablo 1’de gösterilmiştir.

Sağlık Hizmetlerinde Geri Ödeme

Sağlık sistemleri içerisinde bahsedilen sağlık modellerinde ister özel sigorta modelleri olsun ister kamusal kaynaklarla finansmanın sağlandığı modeller olsun, geri ödeme süreçleri kritik önemdedir. Geri ödeme esas olarak sağlık ile ilişkili hizmetler için ödemeler veya tazminatları kapsar. Doğası gereği, sağlık hizmetleri ödemediği önce sağlanabilmekte veya hali hazırda var olan olanaklar ödeme yapılmadan önce kullanılabilir. Bu nedenle sağlık hizmeti sunucuları, daha önce sağlanmış hizmetler için geri ödeme veya tamamlama/telafi ücreti alırlar [12]. Bu kapsamda geri ödeme; finansal

kaynakların devletler, hastalar veya farklı sigorta kurumları gibi kuruluşlardan alınıp sağlık kurumları arasında dağıtılması olarak tanımlanabilmektedir [13].

Tablo 1. Farklı sağlık sistemi modellerinin karşılaştırılması

Model	Beveridge	Bismarck	Özel sigorta
Finansman kaynağı	Genel vergiler	Ücrete bağlı vergiler	Bireysel kaynaklar veya ücrete bağlı katılım
Kapsam	Tüm vatandaşlar	Kapsam farklı gruplarla/bölgelerle sınırlandırılabilir	Bireysel
Altyapısı	Kamusal altyapı	Karma altyapı (kamu ve özel)	Özel kuruluşlar
Sağlık personeline yapılan ödemeler	Devlet tarafından maaş olarak ödenir.	Hizmet başına belirli bir bedel ödenir.	Özel kuruluşlar tarafından ödenir.
Devlet müdahalesi	Devlet müdahalesi söz konusudur.	Devlet düzenleyici konumdadır.	Devlet müdahalesi söz konusu değildir.
Planlanma şekli	Merkezi	Karma	-
Örnek ülkeler	Danimarka, İspanya, İrlanda, İtalya, Portekiz, İsveç, İngiltere	Belçika, Almanya, Fransa, Lüksemburg, Hollanda, Avusturya	Amerika Birleşik Devletleri

Geri ödemeler sağlık hizmet sağlayıcılarına farklı şekillerde yapılabilir. Bu geri ödeme modelleri, etkililik, kalite, eşitlik, tüketici tatmini ve sağlık durumlarına göre farklılıklar gösterebilmekle birlikte, teşvikler, bütçe sınırlılıkları, performans değerlendirmeleri ve ödeme kapsamı gibi çeşitli faktörler de bu farklılıklar üzerinde etkili olabilmektedir [14]. Sağlık hizmeti sunucularına yapılan ödeme yöntemleri hizmet başına yöntemi, belirli bir hastalık periyoduna göre yapılan ödeme yöntemi, bütçeleme ile ödeme yöntemi gibi yöntemlerdir.

Hizmet başına ödeme yönteminde sağlık hizmeti sağlayıcısının sağladığı her birim hizmet için ödeme yapılır [15]. Bu sistemde hizmet sunucusu etkin bir hizmet sunması için teşvik edilmiş olur. Ancak faturalama hataları, fiyatların düzenli olarak kontrol edilmesi nedeniyle gereken idari maliyetler ve maliyetlerin öngörülemez oluşu bu yöntemi dezavantajlı hale getirmektedir. Bu sistemde hastalar seçecekleri kuruluş veya hekim konusunda özgürlerdir, ancak hizmetler karşısında daha çok tamamlayıcı ödeme yapmak veya daha fazla kesinti ile karşılaşmak durumunda kalırlar [15].

Bir hastalığın tedavisi için belirli bir periyoda göre yapılan ödemelerde; sağlık hizmeti sunucuları toptan ve tek bir ödeme alırlar. Bu yöntemde bireysel başvurulardan ziyade, hastalığın tedavisinin tamamı kapsanır. Bu nedenle bireysel ödemeler söz konusu değildir. Yöntem esas olarak hizmet başına

ödeme yönteminde ortaya çıkan sorunların düzeltilmesi için ortaya çıkmıştır. Global ödeme, ileriye dönük ödemeler ve kişi başı ödeme yöntemleri, bu yöntemin farklı tipleridir. Kişi başına ödeme yönteminde sağlık hizmet kuruluşlarına belirli bir süre içerisinde hizmet alan kişi başına sabit birim miktar üzerinden ödeme yapılır. Kişi başına ödeme yönteminde sunulan hizmetlerin mahiyeti veya hacmi önemli değildir. Daha iyi veya daha fazla hizmet sunmak ödeme miktarını arttırmayacağı gibi, daha az hizmet de ödemeleri azaltmayacaktır. Dolayısıyla sağlık hizmetlerinin karmaşıklığı göz ardı edilmiş olur. Bu sistemde ödeyici için maliyetler belirli ve öngörülebilir, servis sağlayıcı açısından da müşteri tabanının garanti altında olmasıdır [12].

Bütçeleme ile ödeme yönteminde önceden belirlenmiş sabit bir tutarın ödenmesi söz konusudur. Kurum seviyesindeki bütçelerde kurumun bütçesindeki fonların kullanımı konusunda takdir yetkisi mevcuttur. Bu yöntemde herhangi bir birim başına hizmet ödemesi söz konusu değildir ve bütçe yönetiminde harcamaların dağılımı karar vericilere bırakılmaktadır. Bununla birlikte bir kere belirlendiği için bu bütçeler üzerinde değişiklik yapmak çok zor, hatta imkânsız olmaktadır [14].

İleriye dönük ödeme yönteminde ise ödeme belirli bir zaman aralığı için önceden yapılır. Ödeme miktarı bir sağlık hizmeti için kullanılan kaynak miktarına bakılarak belirlenir. İleriye dönük ödeme yöntemleri gün başına ödeme ve vaka başına ödeme şeklinde uygulanabilir. Gün başına ödemede hastanın hastanede kaldığı her bir gün başına sabit ödeme yapılır. Ödeme miktarı daha önceki zamanlardan elde edilen veriler ışığında belirlenir. Ancak bu yöntemde hizmet sunucunun hastayı daha çok hastanede tutma eğilimde olması temel eleştiri noktasıdır [12]. Vaka başına ödemede ise sağlık hizmet sunucusuna daha önceden belirlenmiş ve vaka veya hastalık başına belirlenen ücret ödenir. Bu nedenle, vaka başına ödeme yönteminde sağlık hizmet sağlayıcısı daha etkin bir sağlık hizmeti sunmak için teşvik edilmiş olur. Bununla birlikte sağlık hizmeti sunucusu daha fazla ödeme alabilmek için farklı tanımlar bildirebilir [14]. Tüm bu ödeme yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları bakımından karşılaştırılması Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tüm bu yöntemlerin yanında, hastanelerde sunulan hizmetlerin performans değerlendirmeleri ve çeşitli karşılaştırmaların yapılabilmesi için bu kuruluşların sağladığı hizmetlerin sınıflandırılması gerekmiş ve bu kapsamda teşhis ilişkili gruplar adı verilen bir sınıflandırma sistemi oluşturulmuştur [16]. Bu sistemde hastalar teşhis kodlarına (klinik tablo) ve teşhis-tedavi maliyetlerinin verilerine göre gruplandırılır. Benzer hastalıkların belirli gruplarda sınıflandırılması söz konusudur. Bu sistem yalnızca yatan hastalar için kullanılır [17].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Sağlık için ayrılan kaynakların en etkin ve verimli şekilde kullanılmasını ve dağıtımını araştıran sağlık ekonomisi; sağlık politikalarının oluşturulmasını da sağlamaktadır. Sağlık ekonomisinde ekonomi biliminin genel kavramları ile sağlık hizmetlerine yönelik değerlendirmeler yapılabilmekte, bu

Tablo 2. Geri ödeme yöntemlerinin karşılaştırılması

Ödeme Yöntemi	Avantajları	Dezavantajları
Hizmet başına ödeme	Etkin hizmet sunumu için teşvik söz konusudur.	Faturalama kontrolleri için daha fazla idari maliyet söz konusudur. Hastaların bireysel ödemelerinde artış olabilir.
Kişi başına ödeme	Maliyet açısından öngörülebiliridir.	Sağlık hizmetlerinin karmaşıklığı göz ardı edilir.
Bütçeleme ile ödeme	Kurumların bütçe dağıtımında takdir yetkisi vardır.	Bütçe üzerinde değişiklik yapmak neredeyse imkânsızdır.
Gün başına ödeme	Kurumlar açısından öngörülebiliridir.	Hastaların gereğinden fazla hastanede tutulması söz konusu olabilir.
Vaka başına ödeme	Sağlık hizmeti sağlayıcısı daha etkin bir sağlık hizmeti sunmak için teşvik edilmiş olur.	Farklı tanıları bildirilebilir. Her hastalık veya tanı için ödeme belirlemek zordur.

kapsamda uygun düzenlemelerin ortaya çıkması sağlanmaktadır. Sağlık hizmetlerinin dağıtımı ve sunumunda temel aşamalardan biri hizmetler karşılığında yapılan ödemeler ve bu ödemelerin nasıl yapılacağıdır. Bu anlamda esas olarak Beveridge, Bismarck ve özel sigorta yaklaşımı olmak üzere üç farklı yaklaşımın hakim olduğu görülmektedir. Bununla birlikte sağlık hizmetlerinin doğası gereği ödeme tutarları tanı ve tedavi süreçleri tamamlandıktan sonra ortaya çıkmaktadır. Hastalık seyrinin kişiye özel olması maliyetler konusunda kestirim yapabilmeyi zorlaştırmaktadır. Sağlık hizmetlerinde maliyetlerin hesaplanması hususunda ortaya çıkan bu zorluklar çeşitli ödeme yöntemleri ile aşılmaya çalışılmaktadır.

YAZAR KATKILARI

Kavram: *M.B, L.Y., S.Y.*; Tasarım: *M.B, L.Y, S.Y.*; Denetim: *M.B, L.Y., S.Y.*; Analiz ve/veya Yorumlama: *M.B, L.Y., S.Y.*; Literatür taraması: *M.B, L.Y., S.Y.*; Makalenin yazılması: *M.B, L.Y., S.Y.*; Kritik inceleme: *M.B, L.Y., S.Y.*

ÇIKAR ÇATIŞMASI

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

KAYNAKLAR

1. T.C Maliye Bakanlığı Strateji Geliştirme Başkanlığı Web Site. (2018). Retrieved May 15, 2021, from <https://ms.hmb.gov.tr/uploads/2019/11/426-Murat-U%C4%9EURLU-.pdf>. Erişim tarihi: 15.05.2021
2. Yeğenoğlu, S., Emre, H. (2004). Farmakoekonomi alanında temel Kavramlar. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 33(1),41–61. [Crossref]
3. Akalın, E. (1995). Sağlık ekonomisi: Temel tanımlar. *Antibiyotik ve Kemoterapi Dergisi*, 9(3), 233–235.
4. Eroğlu, L. (1995). Tedavi Maliyetinde Güncel Kavramlar. *Antibiyotik ve Kemoterapi Dergisi*, 9(3), 232.
5. Yıldız, N.Ç. (2017). Makro İktisat. İstanbul Üniversitesi Açık ve Uzaktan Eğitim Fakültesi, p.10.
6. Hausman, D.M. (2018). The bond between positive and normative economics. *Revue D'économie Politique*, 128(2), 191–208.
7. Rexford, E., Santerre, S.P.N. (2010). Basic Healthcare Economic Tools and Institutions. In: Rexford E., Santerre SPN., Neun S. (Eds) Health Economics Theories, Insights and Industry Stuides. Fifth Edition. p. 3–35. Ohio: South-Western Cengage Learning.
8. World Health Organization Web site. (2021). Retrieved: May 16, 2021, from: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/environment-and-health/health-impact-assessment/environment-and-health-economics> . Erişim tarihi: 16.05.2021
9. World Health Organization Web site. (2003) Retrieved May 20, 2021, from: <https://www.who.int/whr/2003/en/Chapter7.pdf> . Erişim tarihi: 20.05.2021
10. World Health Organization Web site. (2021) . Retrieved: May 23, 2021, from: https://www.who.int/health-topics/health-financing#tab=tab_1 . Erişim tarihi: 23.05.2021
11. Kulesher, R., Forrestal, E. (2014). International models of health systems financing. *Journal of Hospital Administration*, 3(4), 127–139. [Crossref]
12. Casto, AB., Layman, E. (2006). Principles of healthcare reimbursement. *American Health Information Management Association, Chicago, Illinois*, 1–15.
13. Çelik, Y. (2019). Sağlık Ekonomisi. Siyasal Kitabevi.
14. Barnum, H., Kutzin, J., Saxenian, H. (1995). Incentives and provider payment methods. *International Journal of Health Planning and Management*, 10:, 23–45. [Crossref]
15. Akyürek, Ç.E. (2012). Sağlıkta bir geri ödeme yöntemi olarak global bütçe ve Türkiye. *Sosyal Güvenlik Dergisi*, 2, 124–53.
16. Fetter, R.B., Shin, Y., Freeman, J.L., Averill, R.F., Thompson, J.D. (1980). Case mix definition by diagnosis-related groups. *Medical Care*, ;18(2 Suppl):iii, 1-53.

17. Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Web site. (2014). Retrieved May 25, 2021, from: <https://shgmsgudb.saglik.gov.tr/Eklenti/3292/0/rehber-tig-16122015son-ikpdf.pdf> . Erişim tarihi: 25.05.2021.



YENİ NESİL LİPİT BAZLI İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER: LİPİT NANOKAPSÜLLER

NEW GENERATION LIPID-BASED DRUG DELIVERY SYSTEMS:
LIPID NANOCAPSULES

Hatice DEMİRTAŞ¹ , Ceyda Tuba SENDEL-TURK^{2*} 

¹Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 61000
Trabzon, Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 06560
Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, boyuta bağlı özelliklerinden dolayı giderek artan şekilde ilgi görmektedir. Bu sistemler arasında polimerik nanopartiküller ve lipozomlar en popüler nanotaşıyıcılardandır; ancak bu sistemlerde görülen düşük stabilite, kısa raf ömrü, hazırlanmasında organik çözücü kullanımı, ölçek büyütmenin zor olması gibi dezavantajların üstesinden gelmek için araştırmacılar lipit bazlı nanotaşıyıcılara yönelmiştir. Yeni nesil lipidik taşıyıcılardan olan lipit nanokapsüller (LNC), hidrofilik ve lipofilik sert bir surfaktan kabuk ile çevrelenmiş yağlı sıvı çekirdekten oluşan sistemlerdir ve polimerik nanokapsüller ile lipozomlar arasında yer alan hibrit bir yapıya sahiptirler. Bu derleme kapsamında LNC'ler hakkında genel bilgiler, hazırlama yöntemi ve uygulama yollarına ilişkin bilimsel çalışmalar sunulmuştur.

Sonuç ve Tartışma: Tüm bileşenleri FDA onaylı olan LNC'ler, organik çözücü içermeyen, düşük enerji tüketimli ve ölçek büyütme elverişli patentli bir üretim teknolojisi olan faz inversiyon yöntemiyle kolayca hazırlanabilmektedir. Bu yöntem ile 20-100 nm partikül büyüklüklerinde ve dar bir dağılım aralığında elde edilen LNC'ler yüksek etkin madde yükleme kapasitesine sahip olmaları, yüzey modifikasyonuna elverişli olmaları, yüzeyindeki polietilen glikol zincirleri sayesinde uzun süre kan dolaşımında kalabilmeleri ve fiziksel stabiliteilerinin yüksek olması (18 aya kadar) gibi çok sayıda avantaja sahiptirler. LNC'lerin, lipofilik, amfifilik ve hidrofilik özellikteki pek çok etkin madde için oral, parenteral, topikal, pulmoner yollar gibi çeşitli uygulama yolları kullanılarak farklı farmasötik uygulamalarda kullanılması onların potansiyel ilaç taşıyıcı sistemler olduğunu göstermektedir. Sahip oldukları bu üstün özellikler sayesinde LNC'ler başta lipozomlar ve polimerik nanokapsüller olmak üzere ilaç taşıyıcı sistemlerde gözlenen dezavantajların üstesinden gelerek umut verici alternatif yeni nesil ilaç taşıyıcı sistemler olarak karşımıza çıkmaktadır.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Ceyda Tuba Sengel-Turk
e-posta / e-mail: ctsengel@pharmacy.ankara.edu.tr, Tel. / Phone: +903122033152

Anahtar Kelimeler: Lipit bazlı ilaç taşıyıcı sistemler, lipit nanokapsüller, faz inversiyon yöntemi

ABSTRACT

Objective: Nanoparticulate drug delivery systems are attracting increasing attention due to their size-dependent properties. Among these systems, polymeric nanoparticles and liposomes are the most popular nanocarriers, but to overcome the disadvantages such as low stability, short shelf life, use of organic solvents in preparation, and difficulty in scale-up, researchers have turned to lipid-based nanocarriers. Lipid nanocapsules (LNCs), one of the new generation lipidic carriers, are nanoparticulate systems consisting of an oily liquid core surrounded by a hydrophilic and lipophilic rigid surfactant shell. Their structure is a hybrid nature between liposomes and polymeric nanocapsules. In this review, general information about LNCs, preparation method and scientific studies on application methods are presented.

Result and Discussion: With all components FDA-approved, LNCs can be easily prepared using the phase inversion method, a patented production technology that does not contain any organic solvents, has low energy consumption and is suitable for scale-up. LNCs obtained by this method with particle sizes of 20-100 nm and a narrow size distribution range has many advantages such as having a high drug loading capacity, being suitable for surface modification, being able to stay in the blood circulation for a long time due to the polyethylene glycol chains on the surface, and high physical stability (upwards to 18 months). The use of LNCs in different pharmaceutical applications using various routes of administration such as oral, parenteral, topical, pulmonary routes for many active substances with lipophilic, amphiphilic and hydrophilic properties shows that they are potential drug delivery systems. As a result of these superior properties, LNCs emerge as promising alternative new generation drug delivery systems by overcoming the disadvantages observed in drug delivery systems, especially liposomes and polymeric nanocapsules.

Keywords: Lipid-based drug delivery systems, lipid nanocapsules, phase inversion process

GİRİŞ

Nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemler, 1-1000 nm arasında partikül boyutuna sahip olan yeni nesil ilaç taşıyıcı sistemlerdir [1]. Nanometre boyutundaki partikül büyüklükleri ve sahip oldukları yüzey özellikleri sayesinde bu sistemler; hidrofobik etkin maddelerin çözünürlüğünü ve terapötik etkinliğini arttırmak, yan etkileri azaltmak, etkin maddelerin farmakokinetik özelliklerini iyileştirmek, hızlı degradasyona karşı etkin maddeyi korumak, yarılanma ömürlerini uzatmak, etkin maddelerin salım kinetiğini değiştirerek kontrollü veya sürekli salım yapmak; birden fazla ajanın birlikte verilmesini sağlamak ve çeşitli hedeflendirme stratejileri ile (aktif/pasif hedeflendirme) tümöre hedeflendirilebilmelerini temin etmek gibi çeşitli avantajlara sahiptirler [1, 2, 3, 4, 5].

Nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin başlıcaları polimerik nanopartiküller, lipozomlar, miseller, dendrimerler, lipit-bazlı nanopartiküller (katı lipit nanopartiküller, nano-yapılı lipit taşıyıcılar, lipit nanokapsüller), polimer- veya lipit-ilac konjugatları, niozomlar, siklodekstrinler ve nanosüngerlerdir [6]. Bu sistemler arasında, polimerik nanopartiküller ve lipozomlar en popüler nanotaşıyıcılardandır [7].

Polimerik nanopartiküller, doğal veya sentetik polimerlerden oluşan nanoboyutlu katı partiküllerdir [8]. Lipozomlara kıyasla hidrofobik etkin maddeler için yüksek enkapsülasyon etkinliğine, depolama sırasında yüksek yapısal bütünlüğe ve yüksek stabiliteye sahiptirler [9]; ancak üretim sürecinde organik çözücü kullanılması, ölçek büyütmenin zor olması, hedef bölgeye ulaşana kadar etkin maddenin sızması [10], kandaki dolaşım ömrünün kısa olması, parçalanma ürünleri olan monomerlerin olası toksisitesi ve biyoyumluluk sorunları gibi problemleri bulunmaktadır [11, 12].

Lipozomlar, fosfolipit yapıda, aralarında sulu bir faz bulunan, yapı ve içerik olarak biyolojik membrana benzeyen lipit çift tabakalarının oluşturduğu, mikroskobik boyutlarda, küresel veziküllerdir. Biyoyumlu olması, hem hidrofilik hem lipofilik etkin maddeleri taşıyabilmesi gibi avantajları olmasına rağmen lipofilik etkin maddeler için düşük enkapsülasyon etkinliği, organik çözücülerini içeren hazırlama prosedürleri, raf ömürlerinin kısa olması, stabilitelerinin düşük olması, veziküllerin kandaki dolaşım ömrünün kısa olması gibi çeşitli dezavantajlara sahiptirler [13, 14, 15].

Lipozom ve polimerik nanopartikül gibi popüler kullanılan nanotaşıyıcılarda görülen bu dezavantajların üstesinden gelmek için araştırmacılar yeni arayışlara yönelmiştir ve bu doğrultuda lipit bazlı nanotaşıyıcılar dikkat çekmiştir. Nanoyapılı lipit taşıyıcılar (NLC), katı lipit nanopartiküller (SLN), lipit-etkin madde konjugatları, lipit nanokapsüller (LNC) ve lipit-polimer hibrit nanopartiküller (LPHN) lipit bazlı nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin en önde gelen örneklerini oluşturmaktadırlar [16, 17, 18, 19].

Lipit bazlı nanotaşıyıcılar, sudaki çözünürlüğü düşük olan ve biyoyararlanım problemi gösteren etkin maddeler için ilaç taşıyıcı sistemler olarak giderek artan bir şekilde ilgi görmektedirler. Lipitlerin sahip olduğu GRAS (Generally Recognized as Safe) özellikleri, biyolojik olarak parçalanabilir ve uyumlu olmaları gibi avantajları ile bu sistemler, suda çözünürlüğü düşük olan ve zayıf permeabilite özelliği gösteren etkin maddelerin çözünürlüğünü, dolayısıyla absorpsiyon ve biyoyararlanımlarının artmasına bağlı olarak terapötik etkinliklerini artırmaktadırlar [20]. Ayrıca yüksek etkin madde yükleme ve enkapsülasyon etkinliği sağlamaları, etkin maddenin salım profilinin modifikasyonuna imkan vermeleri, degradasyona karşı etkin maddeyi koruyabilmeleri, stabilizeyi artırmaları ve üretimlerinde organik çözücülerin kullanılmaması dolayısıyla organik çözücü kalıntısı içermemeleri, düşük sistemik toksisite ve düşük sitotoksisite göstermeleri, büyük ölçekte endüstriyel üretimlerinin mümkün olması, otoklav veya gama ışın sterilizasyonuna uygun olmaları gibi pek çok avantaja sahiptirler [21, 22].

Bu derlemenin amacı, lipit bazlı nanotaşıyıcıların önemli bir sınıfı olan lipit nanokapsüllerin yapısını, hazırlama yöntemini ve ilaç taşıyıcı sistem olarak etkinliklerini değerlendirmektir.

Lipit Nanokapsüller

LNC'ler, özellikle hidrofobik etkin maddeler için yeni lipit bazlı ilaç taşıyıcı sistem olarak önerilen katı veya yarı katı bir surfaktan kabuk ile çevrelenen yağlı sıvı çekirdekten oluşan submikron partiküllerdir [23, 24] (Şekil 1).

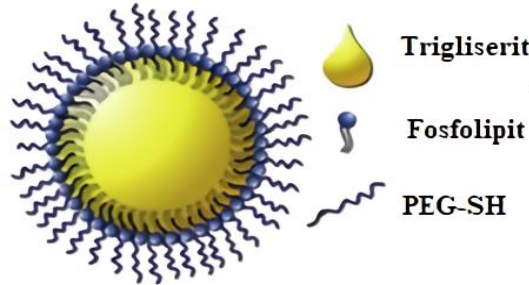
Sert membranla çevrelenmiş yağlı çekirdeği nedeniyle polimerik nanokapsüller ve lipozomlar arasında yer alan hibrit bir yapıya sahiptirler [25, 26].

LNC'ler çeşitli avantajlara sahiptirler [28, 29, 30, 31, 32]. Bunlar;

- 100 nm altındaki partikül büyüklüklerinde (20-100 nm) ve dar bir partikül aralığında hazırlanabilmektedirler. Boyutlarının küçük olmasından dolayı artmış geçirgenlik ve alıkonma etkisiyle (Enhanced Permeability and Retention: EPR) pasif hedeflemeye olanak

sağlamaktadırlar.

- Hedeflemeyi ve terapötik etkinliği iyileştirmek için kolaylıkla yüzey modifikasyonu yapılabilen taşıyıcı sistemlerdir [33].
- Etkin maddenin biyoyararlanımını artırabilir ve intrasellüler internalizasyonu artırarak çoklu ilaç direncinin üstesinden gelebilmektedirler [26].
- Formülasyondaki tüm bileşenler oral, topikal ve parenteral kullanım için FDA tarafından onaylanmıştır [25, 29].
- Hazırlama yöntemleri kolaydır ve organik çözücü içermeyen proseslerle hazırlanabilmektedirler.
- Disperse halde en az bir yıl süreyle (fiziksel stabilite > 18 ay) stabil kalabilmektedirler.
- Hem hidrofilik hem hidrofobik etkin maddeler yüklenebilmektedir [34].
- Lipofilik etkin maddeler için %90'ın üzerinde yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahiptirler [28].
- Yüklenen etkin maddelerin salım profilleri modifiye edilebilmektedir [35].
- Uzun süre kan dolaşımında kalabilmektedirler. LNC'lerin bu özellikleri, hazırlanmasında kullanılan surfaktanın yapısal varlığı olan PEG zincirleri ile kapsül yüzeyinin hidrofiliğine dayanmaktadır.
- Bu özelliklerinden dolayı tedavi maliyetini önemli ölçüde azaltmaktadırlar.



Şekil 1. LNC'lerin genel görünümü [27]

Lipit Nanokapsüllerin Temel Bileşenleri

LNC'ler yapısal açıdan yağ fazı, su fazı ve non-iyonik surfaktan olmak üzere 3 bileşenden oluşmaktadır [29, 36] (Tablo 1).

- **Yağ fazı:** LNC'lerin hazırlanmasında kaprik asit ve kaprilik asidin orta zincirli trigliseritlerin oluşan Labrafac® kullanılmaktadır.
- **Su fazı:** Saf su ve belirli konsantrasyondaki NaCl'den oluşmaktadır.
- **Surfaktan:** Formülasyonda hem hidrofilik hem hidrofobik surfaktanlar kullanılmaktadır.

Hidrofobik surfaktan: %69'u fosfotidilkolin olan soya lesitininden oluşan Lipoid® S75-3 kullanılmaktadır. LNC'nin sert kabuğunu stabilize etmekte ve biyolojik membranlarla biyoyumluluğu artırmaktadır [29].

Hidrofilik surfaktan: PEG-bazlı surfaktanlar kullanılmaktadır. Solutol® HS 15 (HLB = 11), PEG 660 ve PEG 660 hidrosistearat (PEG-HS) karışımından oluşmaktadır. LNC oluşumu ve stabilitesi için ana etkiden sorumludur [37].

Tablo 1. LNC formülasyonunda kullanılan bileşenler

Bileşen	İçerik
Yağ fazı	Orta zincirli trigliserit
Su fazı	Saf su NaCl
Surfaktan	Hidrofilik surfaktan Hidrofobik surfaktan

LNC formülasyonunun önemli bir bileşeni olan PEG-HS sterik stabilizasyon oluşturmaktadır. Ayrıca, PEG-HS'nın kanser hücrelerinde çoklu ilaç direncine katkıda bulunduğu bildirilen P-glikoproteinle ilişkili taşıma sistemlerini bloke ettiği belirlenmiştir. Yüzey aktif maddeler, LNC yüzeyine sıkıca bağlı olmadıklarından ve nanokapsül yüzeyinden difüze olabildiklerinden, serbest PEG-HS ile P-glikoprotein (P-gp) inhibisyonu elde edilebilmektedir [38, 39, 40].

Lamprecht ve Benoit, glioblastoma tedavisinde kullanılmak üzere geliştirdikleri etopozit yüklü LNC'lerin serbest etkin maddeye kıyasla glioblastoma hücrelerindeki konsantrasyonda 5-6 kat artış olduğunu göstermiştir. Burada etkin maddenin salınmasından sonra PEG kabuğu, P-gp'yi geçici olarak baskılayarak daha yüksek hücre içi etopozit konsantrasyonlarına izin vermiştir [38].

Lipit Nanokapsüllerin Hazırlanma Yöntemi

LNC'lerin hazırlanmasında kullanılan en temel yöntem patentli bir üretim teknolojisi olan "Faz İncersiyon Yöntemi"dir [25, 41]. Bu yöntem aşağıda belirtildiği gibi pek çok avantaja sahiptir [23, 28, 32, 42].

- Düşük enerji tüketimi sayesinde LNC hazırlanması kolaydır.
- Hazırlamada kullanılan tüm maddeler biyolojik olarak uyumlu ve biyoparçalanabilir.
- Formülasyonun hazırlanmasında hiçbir organik çözücü veya orta zincirli alkol kullanılmamaktadır. Organik çözücü kalıntı olasılığı olmadığı için de insanda kullanımının güvenli olduğu bildirilmiştir.
- Yüksek oranda surfaktan kullanımına gerek yoktur.
- Ölçek büyütme açısından uygundur.

Faz incersiyon yöntemiyle LNC'lerin hazırlanması, aşağıdaki gibi temelde 2 işlem basamağından oluşmaktadır [25, 32, 41] (Şekil 2).

1. LNC formülasyonu hazırlanırken ilk aşamada, formülasyonu oluşturan tüm bileşenler (yağ fazı, su fazı ve surfaktan) manyetik karıştırıcıda karıştırılmakta ve sonrasında karışımın sıcaklığını faz incersiyon bölgesinin üzerine çıkarmak için bir dizi ısıtma-soğutma (T_2-T_1) döngüsü

gerçekleştirilmektedir. Faz inversiyon bölgesi (PIZ), karışımın iletkenlik ölçüsündeki ani bir değişikliğin saptanmasıyla tanımlanabilmektedir. LNC'lerin yüzey aktif maddelerinden biri olan Solutol'un PEG zincirleri, artan sıcaklıkla dehidrate olmakta ve bu olay, surfaktanın HLB değerinin düşmesiyle lipofilik hale gelmesine neden olarak ve Y/S tipi emülsiyondan S/Y tipi emülsiyonuna faz dönüşümünü başlatmaktadır [25, 44]. Su-yağ ara yüzeylerine uygun, optimum ara yüzey özelliklerini sağlamak için, bu bölge boyunca T_2-T_1 arasında üç ısıtma-soğutma sıcaklık döngüsü gerçekleştirilmektedir (Şekil 3).

Heurtault ve arkadaşları, düşük sıcaklıkta Y/S tipi emülsiyonun sulu sürekli fazından dolayı yüksek iletkenlik değeri elde edileceğini; sıcaklık artırıldığında ise Y/S tipinden S/Y tipi emülsiyona faz dönüşümü gerçekleşeceğinden iletkenlikte hızlı bir düşüş görüleceğini vurgulamışlardır [25] (Şekil 3).

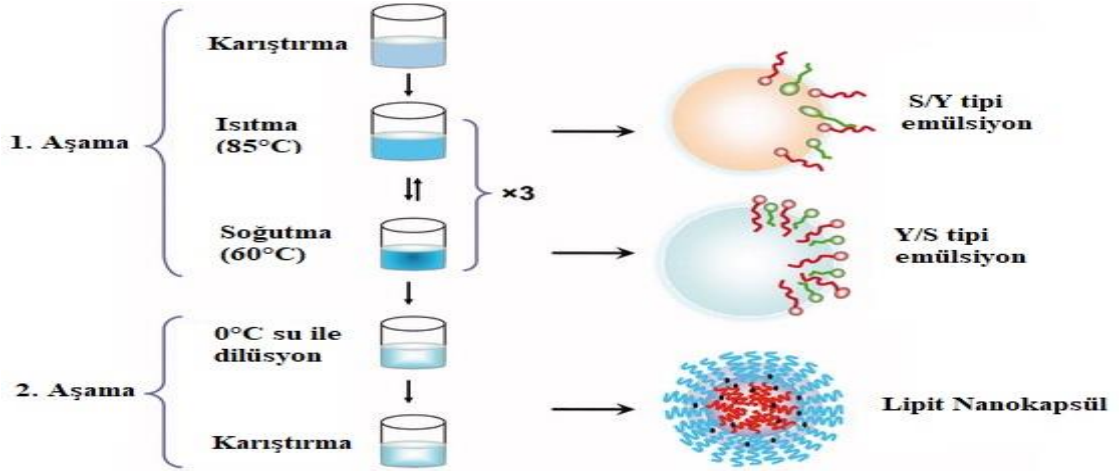
2. İkinci aşamada, sıcaklık döngülerinden sonra önceden belirlenen sıcaklıkta tutulan karışıma soğuk su ilave edilerek ani dilüsyon ile indüklenen geri dönüşümsüz bir şok gerçekleştirilmektedir. Formülasyonun bu ikinci aşaması sulu fazda süspansiyon halinde stabil LNC'nin oluşumuna yol açmaktadır. Ardından süspansiyon oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 5 dakika karıştırılarak dispersiyon şeklinde stabil LNC formülasyonunun oluşumu temin edilmektedir [25] (Şekil 2, Şekil 4).

Heurtault ve arkadaşlarına göre dilüsyonun yapılacağı sıcaklık T_{cd} olarak adlandırılmakta ve genellikle Y/S tipi emülsiyon bölgesinde PIZ'ın başlangıcından $1-3^{\circ}\text{C}$ düşük sıcaklık olarak belirlenmektedir (Şekil 3). Y/S tipi emülsiyonun PIZ'ın başlangıcına yakın bir sıcaklıkta hızlı bir şekilde soğutulması ve seyreltilmesi, PIZ'de elde edilen mikroemülsiyon sistemini kırmak ve kararlı nanometre boyutunda yeni lipidik formülasyonların oluşumuyla sonuçlanmaktadır [25, 39, 45] (Şekil 4).

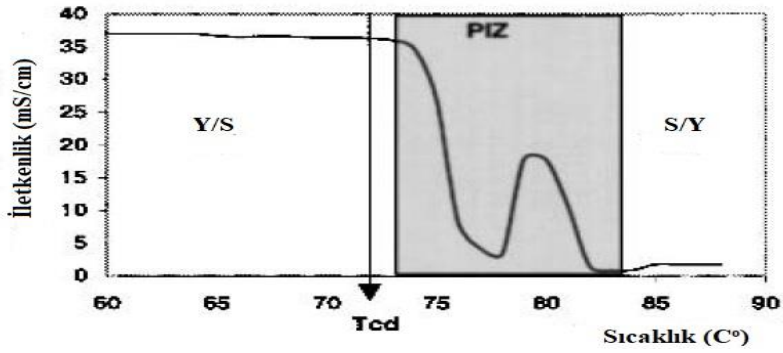
İşlem sonunda elde edilen formülasyonun sıcaklığı, non-iyonik surfaktanın erime noktasının altında olduğu için, kabukta kristallenme meydana gelmekte bu durum, oluşan damlacıkların koalesansını önlemektedir. Bu sert kabuk sayesinde, bu tür süspansiyonlar kriyoprotektan ilavesiyle dondurularak kurutma işlemine olanak sağlamaktadır [29]. Bir çalışmada saklamada kolaylık ve daha yüksek stabilite elde etmek için hazırlanan LNC formülasyonlarına kriyoprotektan olarak laktoz, sükroz, glukoz veya mannitol kullanılarak dondurularak kurutma işlemi uygulanmıştır. Çalışma sonucunda damlacık boyutu, yeniden dağılma süresi ve liyofilize ürünün görünüşü değerlendirildiğinde en ideal kriyoprotektan mannitol (%10) olarak belirlenmiştir [34].

LNC hazırlanmasında misel oluşumunu önlemek ve uygun bir şekilde LNC oluşumunu sağlamak için üçlü diyagramlar kullanılmaktadır. Yağ fazı, sulu fazı ve amfilik yüzey aktif maddenin konsantrasyonlarını birleştiren, özel olarak tasarlanmış bu üçlü diyagramlarda fizibilite alanı tanımlanmaktadır. Heurtault ve arkadaşları, dilüsyondan önceki yüzdeler olmak üzere Lipoid S75-3 ve NaCl oranlarını sırasıyla %1,50 ve %1,75'e sabitlemiş ve %10 ila %40 (a/a) hidrofilik yüzey aktif madde, %35 ila %80 (a/a) su ve %10 ila %25 (a/a) yağ arasındaki miktarların partikül oluşumunu

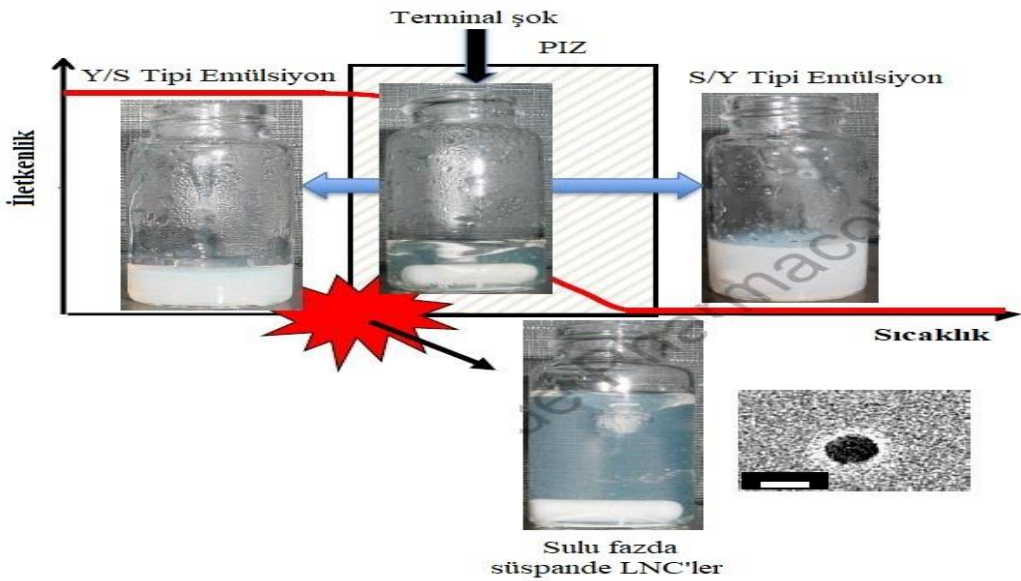
sağladığını tespit etmişlerdir. Bu bileşenler, LNC'nin özelliklerini ayarlamak için bu aralıklar içinde değiştirilebilmektedir [25, 47] (Şekil 5).



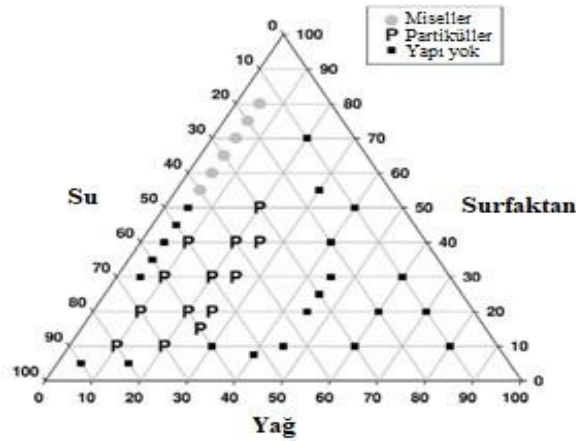
Şekil 2. Faz inversiyon yöntemiyle LNC'lerin hazırlanması [43]



Şekil 3. Dilüsyondan önce sıcaklığın fonksiyonu olarak iletkenlikteki değişim [25]



Şekil 4. LNC oluşumunun şematik gösterimi [46]



Şekil 5. LNC oluşumu üzerine bileşen oranlarının etkisi [47]

Lipit Nanokapsüllerin İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Kullanılması

LNC'lerin sahip oldukları üstün özellikler sayesinde ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanımlarına dair pek çok çalışma bulunmaktadır.

Lipofilik ve Amfifilik Etkin Maddeler İçin Kullanımı

LNC'ler, 20-100 nm arasındaki boyutlarda hazırlanabilmeleri, biyouyumlu yapıları, hazırlama yönteminin kolaylığı ve yüksek enkapsülasyon etkinliği gibi sahip oldukları üstün özellikler sayesinde özellikle lipofilik ve amfifilik etkin maddeler için uygun ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmışlardır [29].

Hidrofobik veya amfifilik yapıda etkin maddeler genel olarak, karışımın yağlı fazında önceden çözündürülmekte ve dilüsyondan sonra lipit yapısı içine girmesini garanti altına almak için ısıtma döngülerine tabi tutulmaktadır. Bununla birlikte, termolabil (sıcaktan etkilenen) etkin maddeler, son ısıtma döngüsünde ani dilüsyondan hemen önce ortama eklenmektedir. Bu yöntem, yüksek sıcaklıklara maruz kaldıklarında denatüre olma eğiliminde olan protein veya antikorların enkapsüle edilmesi için ümit verici bir stratejidir [36]. Bu yöntem dışında PIZ sıcaklıkları formülasyonun içerdiği sodyum klorüründen büyük oranda etkilendiğinden, termolabil maddelerin sıcaklıkla degradasyonu azaltmak için tuz oranıyla bu sıcaklık aralığı ve Tcd değiştirilebilmektedir. Karışımındaki sodyum klorür konsantrasyonunun artırılmasıyla, faz inversiyon bölgesine daha düşük sıcaklıklarda ulaşılmaktadır [25, 29].

LNC'lere, paklitaksel, dosetaksel, SN38, etoposid, hidroksitamoksifen, miltefosin gibi pek çok bileşik enkapsüle edilebilmiştir [42, 44, 48, 49]. LNC'lerin Farmasötik Teknoloji alanındaki ilk literatür çalışması Lamprecht ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [50]. Bu çalışmada amiadoron yüklü LNC'ler hazırlanmış ve karakterizasyon çalışmaları ile etkin madde salım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan LNC'lerin enkapsülasyon etkinlikleri %92-94 arasında bulunmuş, salım deneyinde ise önemli düzeyde ani salım (burst effect) gözlenmezken ilerleyen zamanlarda uzatılmış salım

gözlenmiştir. Amfifilik özellikte olan amidorondan dolayı bu tip bileşikler için uygun ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılabilirler belirtilmiştir.

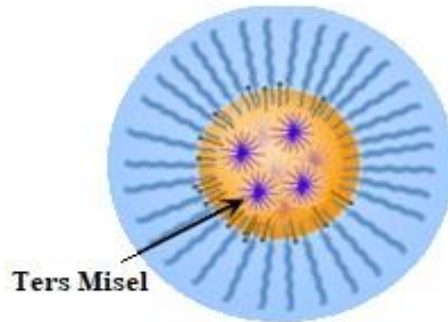
Safwat ve arkadaşları, yüksek lipofilikliğe sahip simvastatinin meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere sistemik etkinliğini artırmak amacıyla partikül büyüklüğü (20,02-93,25 nm) ve PDI (0,047- 0,126) açısından başarılı ve stabil simvastatin yüklü LNC formülasyonlarını hazırlamışlardır. Bu formülasyonlarda başarılı bir şekilde sürdürülebilir salım elde edilmiş ve MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında saf etkin maddeye göre daha düşük IC50 değerlerine ulaşılarak simvastatinin sitotoksitesinin ve etkinliğinin arttığı gözlenmiştir [31].

Vakilzadeh ve arkadaşları, düşük su çözünürlüğüne ve düşük biyoyarlanıma sahip naringenin adlı bileşiğin 29,41 nm çapa ve %99,25 enkapsülasyon etkinliğine sahip LNC formülasyonunu hazırlamışlardır. LNC'ler naringenin çözünürlüğünü 69 kat gibi önemli ölçüde artırmıştır [51]. Basu ve arkadaşları ise meme kanserinin tedavisine yönelik %98'in üzerinde enkapsülasyon etkinliğine sahip ve kontrollü etkin madde salımı sağlayan lipofilik paklitaksel ve salinomisin birlikte içeren LNC'leri başarılı bir şekilde elde etmişlerdir [52].

Hidrofilik Etkin Maddeler İçin Kullanımı

LNC'ler pek çok hidrofilik etkin madde için de uygun taşıyıcı sistemler olarak kullanılmışlardır [42]. Literatürde uygun modifikasyonlar sonucunda fondaparinux [53], DNA [54] ve siRNA [55] gibi hidrofilik moleküller LNC yapısına dahil edilmiştir.

Hidrofilik moleküller, hidrofobik kuyrukların LNC'lerin yağlı çekirdeği içine yerleştirildiği basit bir ters misel sistemi aracılığıyla yapıya dahil edilebilmektedir [42, 56, 57]. Erlotinib hidroklorür [56], akriflavin hidroklorür [58] ve doksorubisin hidroklorür [59] gibi hidrofilik moleküller içeren LNC'ler ters miseller sistem olarak tasarlanmıştır. Burada etkin maddelerin LNC'lerin yağlı çekirdeğine dahil edilebilmesi için öncelikle ters misellerin sulu fazında tutulması gerekmektedir [42]. Misel yüklü yağ, sistemin yağlı sürekli fazına, dilüsyondan hemen önce ilave edilmektedir [57]. Vrignaud ve arkadaşları, hidrofilik doksorubisin hidroklorürü, non-polar ortam olan Labrafac içinde Span 80'in ters misel süspansiyonunda çözüdürmüş ve ardından bu sistemi faz inversiyon sürecinde LNC içine dahil etmiştir [59] (Şekil 6).



Şekil 6. Ters miseller yüklü LNC'ler [59]

Briot ve arkadaşları, kısa yarılanma ömrüne ve düşük biyoyararlanıma sahip hidrofilik özellikle desitabin için akut miyeloid lösemide oral kullanım için LNC formülasyonları tasarlamıştır. LNC formülasyonları yüksek oranda Transcutol® HP (THP-LNC'ler) bazlı LNC'ler ve Transcutol® HP ve Tween® 80 (THP-T80-LNC'ler) karışımı bazlı LNC'ler olmak üzere 2 şekilde hazırlanmıştır. Desitabinin formülasyondaki yükleme miktarını artırmak için etkin maddenin Tween® 80 ve/veya THP içindeki karışımı LNC hazırlanma aşamasındaki son soğutma döngüsünde ortama eklenmiştir. Desitabin yüklü THP-T80-LNC'lerin partikül boyutu 26,5 nm, enkapsülasyon etkinliği ise %85'in üzerinde bulunmuştur [49]. Başka bir çalışmada da hidrofilik yapıdaki 5-florourasil'in LNC çekirdeğine daha yüksek afiniteye enkapsüle edilebilmesi için 5-florourasil öncelikle laurik asit ile modifiye edilerek lipofilik türevinin oluşturulması sağlanmış ve bu şekilde enkapsülasyon etkinliği %90'nın üzerinde elde edilmiştir [60].

Lipit Nanokapsüllerin Uygulama Yolları

Kolloidal partiküllerin ve lipit taşıyıcı sistemlerin avantajlarını bünyesinde barındıran LNC'lerin, oral, parenteral, topikal yol gibi çeşitli uygulama yollarına yönelik kullanımına dair pek çok çalışma bulunmaktadır [23, 53, 61].

Oral Uygulama

LNC'ler çeşitli etkin maddelerin oral kullanımı için taşıyıcı görevi görerek biyoyararlanım ve etkinliklerinin artmasına olanak sağlamaktadır. Bu taşıyıcı sistemlerin etkin maddelerin biyoyararlanımları üzerindeki etkisi; etkin maddenin çözünürlüğünü artırması, P-gp inhibitörü özellikleri sayesinde enkapsüle edilmiş etkin maddenin permeabilitesini artırması ve ayrıca yağlı çekirdekte moleküler düzeyde çözündürülmüş etkin maddenin transitözuna ve gastrointestinal taşınmasına izin vererek aktif endositik yolakla internalizasyona olanak sağlamasıyla açıklanmaktadır [62]. Ayrıca lipitler, ilk geçiş etkisinden kaçıp etkin maddenin lenfatik dolaşımıyla taşınarak absorpsiyon yolunu değiştirebilmektedir [63].

Roger ve arkadaşları, LNC'lerin *in vitro* gastrointestinal stabilitesini farklı stres koşulları altında çeşitli ortamlarda incelemiştir. Sonuçlar, LNC'lerin mide ortamı ve açlık durumu bağırsak ortamında stabil olduklarını göstermiştir [64]. Bu araştırmacılar başka bir çalışmalarında SN38'in oral kullanımı için LNC formülasyonlarını geliştirmişlerdir. Caco-2 hücre hattı boyunca SN38 yüklü LNC'ler, serbest SN38'e kıyasla etkin madde permeabilitesini artırmıştır [48].

LNC'lerin oral kullanımına yönelik yapılan bazı çalışmalar Tablo 2'de özetlenmiştir.

Parenteral Uygulama

LNC'lerin parenteral kullanımına dair pek çok çalışma bulunmaktadır. Farelerde, LNC'lerin intravenöz uygulanmasından sonra elde edilen klinik öncesi toksikolojik veriler, bu nano taşıyıcıların iyi bir güvenlik profili sergilediğini göstermiştir [69].

Tablo 2. LNC'lerin oral kullanımına dair yapılan çalışmalar

Etkin Madde	Taşıyıcı Sistem	PB/PDI	EE	Sonuç	Deney Hayvanı/Doz	Kaynak
Tedrandin fosfolipit kompleksi (TPC)	TPC-LNC	40 nm/ 0,155	%93,9	Zayıf su çözünürlüğü olan tedrandrinin oral biyoyararlanımını arttırmak için hazırlanan TPC-LNC'lerin, tedrandrin tabletlere kıyasla bağıl biyoyararlanımı %208 olarak bulunmuş ve tedrandrinin oral absorpsiyonunda önemli bir artış olduğu vurgulanmıştır.	Sprague - Dawley türü ratlar 2,4 mg/kg	[34]
Fondaparin uks (FP)	FP-cLNC	~50 nm/ <0,22	%93,5	Oral yoldan alındığı zaman düşük absorpsiyon gösterdiğinden sadece parenteral yolla kullanılan FP, LNC ile formüle edildiğinde FP-cLNC'lerde etkin madde, artan oral mutlak biyoyararlanım (~%21'e kadar) ile lineer farmakokinetik profili göstermiştir.	Male Wistar türü ratlar 0,5, 2 ve 5 mg/kg	[53]
Paklitaksel (PTX)	PTX-LNC	60,9 nm/<0,2	%99,9	PTX'in piyasa preparatı olan Taxol® ile gerçekleştirilmiş karşılaştırmalı çalışmalarda oral yoldan sıçanlara uygulanan PTX-LNC'ler, PTX'in oral biyoyararlanımını Taxol'e göre yaklaşık üç kat artırmıştır. Ayrıca LNC yüzeyindeki Solutol HS15'in P-gp eflüks sistemini inhibe etmesiyle, tedavide verapamil gibi P-gp inhibitörlerinin kullanımından kaçınılacağı vurgulanmıştır.	Sprague - Dawley türü ratlar 10 mg/kg	[39]
Tansinon IIA (TSIIA)	TSIIA-LNC	70,99 nm/ 0,096	%98	<i>In-vivo</i> farmakokinetik çalışmalarda, TSIIA süspansiyonuna kıyasla TSIIA-LNC'ler, AUC'de yaklaşık 3.6 kat artış ile oral biyoyararlanımı büyük oranda iyileştirmiştir. TSIIA-LNC'lerin hem yarılanma ömründe hem de MRT'de önemli bir artış sergilemesiyle LNC'lerin uzun süre dolaşımında kalma özellikleri doğrulanmıştır.	Male Wistar türü ratlar 10 mg/kg	[62]
İbuprofen (İBU)	İBU-LNC	47 nm/ 0,094	%96,4	İBU-LNC'nin oral uygulaması, eğri altındaki alanda (EAA) %18'lik ve ortalama kalış süresinde (MRT) %27'lik bir artış sağlamıştır. İBU-LNC, serbest İBU çözeltisine kıyasla oral uygulamadan sonra daha sürdürülebilir salım ile uzun süreli antinoseptif etki sergilemiştir.	Sprague - Dawley türü ratlar 50 mg/kg	[65]
Prazikuantel (PZQ)	PZQ-LNC	46-62 nm/ 0,01-0,08	%95	Tek bir oral PZQ-LNC dozu, Schistosoma mansoni ile enfekte farelerde PZQ'nin antiskizozomal aktivitesini önemli ölçüde artırmıştır.	<i>Schistosoma mansoni</i> enfekte fareler 250 mg/kg	[66]
Efavirenz (EFV)	EFV-LNC	60,71 nm/ 0,09	%92,6	<i>Ex vivo</i> permeasyon çalışmalarında serbest etkin madde süspansiyonu ile karşılaştırıldığında EFV-LNC formülasyonlarında, EFV'nin intestinal permeasyonunun arttığı gözlenmiştir.	Male Wistar rat bağırsağı	[67]
Albendazol (ABZ)	ABZ-LNC	47,9 nm/ 0,08	%97,5	ABZ-LNC'ler, oral yolla uygulanan ABZ süspansiyonuna kıyasla daha yüksek bir kemoprofilaktik etkinlik göstermiştir. ABZ-LNC ile tedavi edilen 10 fareden 4'ünde herhangi bir kist gelişmezken, ABZ süspansiyon grubundaki tüm farelerde enfeksiyon ilerlemiştir.	CF-1 fareler 5 mg/kg	[68]

PB: Partikül Büyüklüğü, PDI: Polidispersite İndeksi, EE: Enkapsülasyon Etkinliği

Khalid ve arkadaşları, katı tümörlerin tedavisi için 80-120 nm boyutlarında hidrofobik yapıya sahip bir etkin madde olan dosetaksiel (DTX) yüklü DSPE-PEG kaplı LNC hazırlamışlardır. Kolon adenokarsinom modeli oluşturulmuş farelere DTX veya DTX- LNC formülasyonları enjekte edilmiş ve *in vivo* farmakokinetik profili ve biyodağılımı değerlendirildiğinde DTX- LNC’de etkin maddenin biyolojik yarılanma ömrünün arttığı ve tümörlü bölgede yüksek seviyede birikimin gerçekleştiği gözlenmiştir [70].

Parenteral beslenme için hem yağların sulu faza kolayca dahil edilmesini sağlamak hem de stabil bir parenteral karışımı elde etmek için LNC’lerin kullanıldığı bir çalışmada herhangi bir stabilite problemi olmadan bitkisel yağ (zeytin yağı, soya yağı) bazlı LNC’lerin parenteral beslenme karışımlarına dahil edilmesi sağlanmıştır [71].

LNC’lerin parenteral kullanımına dair yapılan bazı çalışmalar Tablo 3’te özetlenmiştir.

Tablo 3. LNC’lerin parenteral kullanımına dair yapılan çalışmalar

Etkin Madde	Taşıyıcı Sistem	PB/PDI	EE	Sonuç	Deneysel Hayvanı/ Uygulama Yolu / Doz	Kaynak
Kurkumin (CCM)	CCM-LNC	50,1 nm/0,06	%86	Serbest CCM çözeltisiyle kıyaslandığında CCM-LNC’lerde, IC50 değerinin iki kat düştüğü ve gliomal hücrelerin canlılığında önemli bir azalma olduğu bulunmuştur. CCM-LNC’lerin sağlıklı farelerdeki farmakokinetik çalışmalarında ise AUC, C _{max} and t _{1/2} ’de ciddi bir artış gözlenmiştir.	Fischer F344 ratlar, IV 10 mg/kg	[26]
Akriflavin hidroklorür (ACF)	ACF-RM-LNC	29,21nm/0,033	%82,87	ACF-LNC’ler, serbest ACF’ye kıyasla daha yüksek bir antitümör etkinlik göstermiştir. LNC kullanımı, ACF’nin neden olduğu toksisiteyi baskılayarak, serbest etkin maddeye kıyasla sürdürülebilir salım sağlamış, ilacın uygulama sayısını büyük ölçüde (12 enjeksiyondan 2 enjeksiyona) azaltmıştır.	Murin ortotopik meme kanseri modeli oluşturulmuş fareler, IP 5 mg/kg	[58]
Paklitaksel (PTX)	PTX-LNC	67,5 nm/ < 0,1	%100,5	PTX-LNC formülasyonlarının Taxol’e kıyasla, LD50 değerinde ve maksimum tolere edilebilir dozda sırasıyla sekiz kat ve on bir kat artış belirlenmiş ve bu şekilde tedavi etkinliğinde iyileşme sağlanmıştır.	Akciğer kanser modeli oluşturulmuş fareler, IV 12 mg/kg	[69]
Ferrosifenol (FcdiOH)	DSPE-mPEG ₂₀₀₀ -FcdiOH-LNC	52,85nm/0,075	%98,46	Etkin madde yüklü LNC’ler, EPR etkisiyle pasif hedeflendirme sayesinde tümörü neredeyse ortadan kaldırarak güçlü bir antitümör etki sergilemiştir.	Gliosarkoma modeli oluşturulmuş fareler, IV 2,4 mg/kg	[72]
Ferrosenil tamoksifen (FcOHTAM)	FcOHTA M-LNC	53,9 nm/ -	%100	Tedavi edilmeyen kontrol grubuna kıyasla 38. günde %36’lık bir farkla önemli ölçüde daha düşük bir tümör hacmi elde edilmiştir.	Meme kanseri modeli oluşturulmuş fareler, IP 20 mg/kg	[73]

IV: İntravenöz, IP: İntraperitoneal

Pulmoner Uygulama

Pulmoner uygulama, diğer ilaç uygulama yollarına kıyasla solunum yolu hastalıklarının tedavisi için birçok avantaj sunmakta ve biyomoleküller dahil olmak üzere çok sayıda aktif farmasötik bileşenin lokal ve sistemik verilmesi için kullanılmaktadır. LNC'ler pulmoner uygulama için potansiyel ilaç taşıyıcı sistemlerdir [74, 75].

Hureau ve arkadaşları, paklitakselin nebulizasyon yoluyla pulmoner yolla verilmesini sağlamak için paklitaksel yüklü LNC'ler geliştirmiş (PTX-LNC) ve LNC dispersiyonlarını, nanokapsül yapısında herhangi bir değişiklik olmadan ticari nebulizörler ile aerosol haline getirmişlerdir. Çalışmada aerodinamik çap 2,7 µm ve ince partikül fraksiyonu ise (1,0-5,0 µm) %81,5 olarak bulunmuştur. Bu ana aerosol parametrelerinin, insan kullanımı için bronşiyal hedef ile oldukça uyumlu olduğu vurgulanmıştır [76]. Etkin madde yüklenmemiş LNC'lerin ve PTX-LNC'lerin tek doz pulmoner uygulamasının toksisitesinin incelediği bir çalışmada ise 60 günlük toksisite analizinde sıçanlarda hiçbir kalıntı lezyon olmaksızın kısa süreli bir alveolar inflamasyona neden olduğu ve LNC'lerin, PTX'in pulmoner taşınımı için potansiyel bir ilaç taşıyıcısı olduğu belirtilmiştir [74].

Umerska ve arkadaşları, inhale flutikazon propiyonatın (FP) taşınımı için LNC'leri kullanmış ve nebulizasyon şartları altında aerosol damlaları içinde LNC süspansiyonlarının davranışları incelenmişlerdir. Nebulizasyon, FP'nin nanokapsül yapısından sızmasına neden olmamış ve nebulizasyondan sonra faz ayrılması gözlenmemiştir. Daha az miktarda surfaktan ve daha büyük miktarda yağ içeren 100 nm çaplı LNC'ler, 30 veya 60 nm LNC'lere kıyasla nebulizasyon sırasında daha iyi FP yükleme kapasitesi ve daha iyi stabilite sergilemiştir [77].

Kuru toz inhalasyonla kullanılmak üzere LNC-Trojan mikropartikülleri adı verilen püskürtmeyle kurutulmuş karbonhidrat bazlı mikropartiküllerin elde edildiği bir çalışmada LNC'lerin varlığının, püskürtmeyle kurutulmuş partiküllerin boyutu ve morfolojisi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, püskürterek kurutma işlemi, LNC özelliklerini iyi bir şekilde korumuş ve redisperse edildiklerinde LNC'leri tahrip etmemiştir [75].

Dermal ve Transdermal Uygulama

LNC'lerin, kurkumin [78], ropivakain [79], ketorolak trometamin [80], ibuprofen [81] gibi pek çok etkin madde için dermal/transdermal kullanımı rapor edilmiştir.

Ropivakain (RPV) ile hazırlanan LNC'lerin *in vitro* ve *in vivo* cilt penetrasyon çalışmasında LNC'ler ile cilt yüzeyi arasındaki etkileşimin stratum corneum'un görünen morfolojisini değiştirdiği, korneosit katmanlarının yakın konjugasyonunu kırdığı belirlenmiş ve RPV-LNC'ler uygulandığında dermis içinde tutulan yüksek RPV seviyesi ile LNC'lerin transdermal RPV taşınımı için uygun aday olduğu kanıtlanmıştır [79].

Hatahet ve arkadaşları, güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar özellikte olan ancak zayıf su çözünürlüğüne ve düşük stabiliteye sahip kuersetinin dermal yoldan uygulanmasını sağlamak için 20

nm ve 50 nm boyutlarında kuersetin yüklü-LNC formulasyonları hazırlamışlardır. Geliştirilen formülasyon ile kuersetinin suda çözünürlüğünün arttığı, uzatılmış salımın sağlandığı ve antioksidan aktivitenin korunduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak, lipofilik yapısı ve cilt üzerindeki okluzif etkisi ile LNC'lerin, kuersetinin dermal uygulaması için umut verici bir strateji sunduğu belirtilmiştir [82]. Kuersetin üzerine yapılan başka bir çalışmada da lipozom ve smart kristal (smartCrystals®) formülasyonlarına kıyasla LNC'ler daha üstün penetrasyon kapasitesi göstermiştir [83].

İtrakonazol (ITC) yüklü jel bazlı LNC'lerin topikal uygulamasına yönelik gerçekleştirilen bir çalışmada, ITC yüklü NLC'ler ile karşılaştırıldığında artmış antifungal aktivite sağlanmıştır [84].

Oküler Uygulama

LNC'ler son yıllarda oftalmolojide kullanımları için ilaç taşıyıcı sistemler olarak araştırılmıştır. Formica ve arkadaşları, nörovasküler oküler hastalıkların tedavisinde kullanılmak için yüzeyinde etkili bir terapötik antikör olan bevasizumab (BVZ) ve çekirdeğinde triamsinolon asetonid (TA) içerecek şekilde tasarladıkları hibrit LNC'lerin (BVZ-TA-LNC) endotel hücre kaybını ve vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) tarafından indüklenen kılcal oluşumunu önemli ölçüde önlediğini belirlemişlerdir [85].

Kuru tip makula dejenerasyonunda retina fonksiyonlarını oksidatif stres ve apoptoza karşı korumak için göz damlası geliştirilmesinin amaçlandığı bir çalışmada ise hazırlanan astragalosit-IV (ASIV) fosfolipit kompleksini içeren LNC'lerin (ASIV-LNC) ROS üretimini azalttığı, apoptoz oranını %5,12'den %0,533'e düşürdüğü ve retinanın morfolojisi ve işlevi üzerinde iyi bir koruyucu etkiye sahip olduğu gözlenmiştir [86].

Zhang ve arkadaşlarının kuru göz sendromunun tedavisinde kullanılmak üzere hazırladıkları siklosporin A (CsA) yüklü LNC (CsA-LNC) göz damlaları, CsA emülsiyonlarına kıyasla geçirgenlikte ve biyoyararlanımda yüksek artış oranıyla daha iyi bir tedavi etkinliği sağlamıştır [87]. Aynı etkin madde ile yapılan başka bir çalışmada da CsA-LNC içeren kitozan/poloksomer in situ jel formülasyonu gözde irritasyona neden olmadan mukoadezyonda artış sağlamıştır [61].

Diğer Uygulama Yolları

LNC'lerin nazal, mukozal uygulanmasına dair de çalışmalar literatürde bulunmaktadır. Mohsen ve arkadaşları, subaraknoid kanamaya bağlı vazospazmı tedavi etmek için yaygın olarak intravenöz kullanıldığında hipotansiyon, bradikardi, aritmi gibi çeşitli yan etkilere neden olan nimodipinin (NM) LNC formulasyonlarını intranasal uygulama için tasarlamışlardır. Hazırlanan NM-LNC'ler, intravenöz uygulanan NM çözeltisiyle karşılaştırıldığında daha düşük pik plazma konsantrasyonu ile yavaş eliminasyon hızı sergilemiştir. İntranazal LNC'ler, daha düşük uygulama sıklığı ve minimum yan etkilerle, NM'nin beyne etkili bir şekilde taşınmasını sağlayabilmiştir [23].

Abozaid ve arkadaşları, viral ağız enfeksiyonlarının tedavisinde oromukozal uygulama ile kullanılmak üzere jel formunda asiklovir (ACV) yüklü LNC'ler hazırlamışlardır. *Ex vivo* permeasyon

verileri, ticari kreme (%5) kıyasla daha düşük doz etkin madde içermesine rağmen LNC jellerinde (%0,3) artmış ACV geçirgenliği ve karşılaştırılabilir membran retansiyonu göstermiştir [88].

LNC'lerin bukal uygulanmasına yönelik yapılan başka bir çalışmada karbopol jel içine dahil edilen lidokain ve lidokain yüklü LNC'ler, LNC olmadan hazırlanan jel formülasyonuna kıyasla anestezi süresini dört kat artırmıştır [24].

SONUÇ VE TARTIŞMA

LNC'ler, lesitin ve PEG bazlı polimerlerin karışımından yapılmış bir polimer tabakasıyla çevrelenmiş yağlı bir sıvı çekirdekten (orta zincirli trigliseritler) oluşan nanopartiküler sistemlerdir. LNC'ler 100 nm altında dar bir partikül boyutu aralığında kolayca hazırlanabilmeleri, yüksek etkin madde yükleme kapasitesine sahip olmaları, yüzey modifikasyonuna elverişli olmaları, yüzeyindeki PEG zincirleri sayesinde uzun süre kan dolaşımında kalabilmeleri ve fiziksel stabiliteilerinin yüksek olması gibi pek çok avantajlara sahiptirler.

LNC'ler, biyolojik olarak uyumlu ve biyoparçalanabilir moleküllerle, organik çözücü içermeyen, düşük enerji tüketimli, patentli bir üretim teknolojisi olan "Faz İncersiyon Yöntemi" ile hazırlanabilmektedir. Bu yöntem ile üretilen LNC'lerin ölçek büyütme açısından elverişli olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir [44, 60].

LNC'ler, lipozom ve polimerik nanopartikül gibi popüler bir şekilde kullanılan nanotaşıyıcılarda görülen düşük stabilite, kısa raf ömrü, hazırlanmasında organik çözücü kullanımı, ölçek büyütmenin zor olması gibi dezavantajların üstesinden gelerek üstün özelliklerde hibrit yapıya sahip ilaç taşıyıcı sistemler olarak görülmektedir.

LNC'ler sahip oldukları stabil yapıları ve biyolojik açıdan uyumlu özellikleri sayesinde pek çok etkin madde için oral, parenteral, topikal yol gibi çeşitli uygulama yolları ile ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmıştır. LNC'ler özellikle zayıf su çözünürlüğü nedeniyle klinik uygulamalarında ciddi bir sorun oluşturan hidrofobik etkin maddeler için yüksek yükleme kapasitesine sahiptirler. Bu etkin maddeler ile geliştirilen LNC formülasyonları sayesinde çözünürlük ve biyoyararlanımda ciddi artış temin edilmekte ve sistemik etki sağlanabilmektedir. LNC'ler, ayrıca ters miseler sistem ya da uygun modifikasyonlar ile hidrofilik etkin maddeleri de enkapsüle edebilmektedir.

Sonuç olarak, yüksek yükleme kapasitesi temin edebilen, organik çözücü kullanımı gerektirmeyen ve bu açıdan diğer nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlama yöntemlerine kıyasla daha çevre dostu kabul edilen ve ölçek büyütme işlemine uyumu ile endüstriye adapte edilebilen patentli bir üretim tekniği olan faz incersiyon yoluyla hazırlanan LNC'ler, pek çok uygulama yolu ile verilise elverişli olan ve farklı hastalıkların tedavisinde terapötik etkinliği artıran yeni nesil lipit bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerdir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: *H.D., C.T.Ş.T.*; Tasarım: *H.D., C.T.Ş.T.*; Denetim: *C.T.Ş.T.*; Kaynaklar: *H.D., C.T.Ş.T.*; Malzemeler: *H.D., C.T.Ş.T.*; Veri Toplama ve/veya işleme: *H.D., C.T.Ş.T.*; Analiz ve/veya yorumlama: *H.D., C.T.Ş.T.*; Literatür taraması: *H.D., C.T.Ş.T.*; Makalenin yazılması: *H.D., C.T.Ş.T.*; Kritik inceleme: *H.D., C.T.Ş.T.*; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Hong, Y., Rao, Y. (2019). Current status of nanoscale drug delivery systems for colorectal cancer liver metastasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 114, 108764. [\[CrossRef\]](#)
2. Rogueda, P.G., Traini, D. (2007). The nanoscale in pulmonary delivery. Part 1: deposition, fate, toxicology and effects. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 4(6), 595-606. [\[CrossRef\]](#)
3. Narvekar, M., Xue, H.Y., Eoh, J.Y., Wong, H.L. (2014). Nanocarrier for poorly water-soluble anticancer drugs-barriers of translation and solutions. *Aaps Pharmscitech*, 15(4), 822-833. [\[CrossRef\]](#)
4. Sengel-Turk, C.T., Hascicek, C., Dogan, A.L., Esendagli, G., Guç, D., Gonul, N. (2014). Surface modification and evaluation of PLGA nanoparticles: the effects on cellular uptake and cell proliferation on the HT-29 cell line. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 24(2), 166-172. [\[CrossRef\]](#)
5. Shao, K., Singha, S., Clemente-Casares, X., Tsai, S., Yang, Y., Santamaria, P. (2015). Nanoparticle-based immunotherapy for cancer. *ACS Nano*, 9(1), 16-30. [\[CrossRef\]](#)
6. Bidram, E., Esmaeili, Y., Ranji-Burachaloo, H., Al-Zaubai, N., Zarrabi, A., Stewart, A., Dunstan, D.E. (2019). A concise review on cancer treatment methods and delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 54, 101350. [\[CrossRef\]](#)
7. Krishnamurthy, S., Vaiyapuri, R., Zhang, L., Chan, J.M. (2015). Lipid-coated polymeric nanoparticles for cancer drug delivery. *Biomaterials Science*, 3(7), 923-936. [\[CrossRef\]](#)
8. Yadav, H.K., Almokdad, A.A., Sumia, I.M., Debe, M.S. (2019). Chapter 17. Polymer-based nanomaterials for drug-delivery carriers. In: Mohapatra S.S., Ranjan S., Dasgupta N., Mishra R.K., Thomas S. (Eds.), *Nanocarriers for Drug Delivery*, Elsevier, ISBN: 9780128140338, (pp. 531-556). [\[CrossRef\]](#)
9. Cheow, W.S., Hadinoto, K. (2011). Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 214-220. [\[CrossRef\]](#)

10. Thanki, K., Gangwal, R.P., Sangamwar, A.T., Jain, S. (2013). Oral delivery of anticancer drugs: challenges and opportunities. *Journal of Controlled Release*, 170(1), 15-40. [\[CrossRef\]](#)
11. Sengel-Türk, C.T., Gumustas, M., Uslu, B., Ozkan, S.A. (2017) Chapter 10. Nano-sized Drug Carriers for Oral Delivery of Anti-Cancer Compounds and the Place of the Chromatographic Techniques. In: Grumezescu, A.M (Ed.), *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems*, 1st Edition”, Elsevier, ISBN: 9780323527279, (pp.165-195). [\[CrossRef\]](#)
12. Dave, V., Tak, K., Sohgaara, A., Gupta, A., Sadhu, V., Reddy, K.R. (2019). Lipid-polymer hybrid nanoparticles: Synthesis strategies and biomedical applications. *Journal of Microbiological Methods*, 160, 130-142. [\[CrossRef\]](#)
13. Allen, T.M., Cullis, P.R. (2013). Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 36-48. [\[CrossRef\]](#)
14. Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S.Y., Sood, A.K., Hua, S. (2015). Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 286. [\[CrossRef\]](#)
15. Daraee, H., Etemadi, A., Kouhi, M., Alimirzalu, S., Akbarzadeh, A. (2016). Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(1), 381-391. [\[CrossRef\]](#)
16. Badilli, U., Sengel-Türk, C.T., Onay-Besikci, A., Tarimci, N. (2015). Development of etofenamate-loaded semisolid SLN dispersions and evaluation of anti-inflammatory activity for topical application. *Current Drug Delivery*, 12(2), 200-209. [\[CrossRef\]](#)
17. Teixeira, M.C., Carbone, C., Souto, E.B. (2017). Beyond liposomes: Recent advances on lipid based nanostructures for poorly soluble/poorly permeable drug delivery. *Progress in Lipid Research*, 68, 1-11. [\[CrossRef\]](#)
18. Rassouli, A., Al-Qushawi, A. (2018). Lipid-based nanoparticles as novel drug delivery systems for antimicrobial agents. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 10(2), 1-16. [\[CrossRef\]](#)
19. Bakar-Ates, F., Ozkan, E., Sengel-Türk, C.T. (2020). Encapsulation of cucurbitacin B into lipid polymer hybrid nanocarriers induced apoptosis of MDAMB231 cells through PARP cleavage. *International Journal of Pharmaceutics*, 586, 119565. [\[CrossRef\]](#)
20. Carbone, C., Leonardi, A., Cupri, S., Puglisi, G., Pignatello, R. (2014). Pharmaceutical and biomedical applications of lipid-based nanocarriers. *Pharmaceutical Patent Analyst*, 3(2), 199-215. [\[CrossRef\]](#)
21. Chakraborty, S., Shukla, D., Mishra, B., Singh, S. (2009). Lipid—an emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 73(1), 1-15. [\[CrossRef\]](#)
22. Attama, A.A., Momoh, M.A., Builders, P.F. (2012). Chapter 5. Lipid nanoparticulate drug delivery systems: a revolution in dosage form design and development. In: Sezer, A.D (Ed.), *Recent advances in novel drug carrier systems*, Intech, ISBN: 9789535108108, (pp. 107-140). [\[CrossRef\]](#)
23. Mohsen, K., Azzazy, H.M., Allam, N.K., Basalious, E.B. (2020). Intranasal lipid nanocapsules for systemic delivery of nimodipine into the brain: In vitro optimization and in vivo

- pharmacokinetic study. *Materials Science and Engineering: C*, 116, 111236. [\[CrossRef\]](#)
24. Fernandes, P.C.L., de Moura, L.D., de Lima, F.F., da Silva, G.H.R., Souza, R.I.C., de Paula, E. (2021). Lipid nanocapsules loaded with prilocaine and lidocaine and incorporated in gel for topical application. *International Journal of Pharmaceutics*, 602, 120675. [\[CrossRef\]](#)
 25. Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E., Benoit, J.P. (2002). A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharmaceutical Research*, 19(6), 875-880. [\[CrossRef\]](#)
 26. Lollo, G., Ullio-Gamboa, G., Fuentes, E., Matha, K., Lautram, N., Benoit, J.P. (2018). In vitro anti-cancer activity and pharmacokinetic evaluation of curcumin-loaded lipid nanocapsules. *Materials Science and Engineering: C*, 91, 859-867. [\[CrossRef\]](#)
 27. Paillard, A., Hindré, F., Vignes-Colombeix, C., Benoit, J.P., Garcion, E. (2010). The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability. *Biomaterials*, 31(29), 7542-7554. [\[CrossRef\]](#)
 28. Saulnier, P., Benoit, J.P. (2006). Lipidic core nanocapsules as new drug delivery systems. In: Torchilin, V.P. (Ed.), *Nanoparticulates as drug carriers*, (pp. 213-224). [\[CrossRef\]](#)
 29. Huynh, N.T., Passirani, C., Saulnier, P., Benoit, J.P. (2009). Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. *International Journal of Pharmaceutics*, 379(2), 201-209. [\[CrossRef\]](#)
 30. Aparicio-Blanco, J., Torres-Suárez, A.I. (2015). Glioblastoma multiforme and lipid nanocapsules: a review. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11(8), 1283-1311. [\[CrossRef\]](#)
 31. Safwat, S., Hathout, R.M., Ishak, R.A., Mortada, N.D. (2017). Augmented simvastatin cytotoxicity using optimized lipid nanocapsules: a potential for breast cancer treatment. *Journal of Liposome Research*, 27(1), 1-10. [\[CrossRef\]](#)
 32. Molaahmadi, M.R., Varshosaz, J., Taymouri, S., Akbari, V. (2019). Lipid Nanocapsules for Imatinib Delivery: Design, Optimization and Evaluation of Anticancer Activity Against Melanoma Cell Line. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 18(4), 1676. [\[CrossRef\]](#)
 33. Chouchou, A., Aubert-Pouëssel, A., Dorandeu, C., Zghaib, Z., Cuq, P., Devoisselle, J.M., Bonnet, P.A., Bégu S., Deleuze-Masquefa, C. (2017). Lipid nanocapsules formulation and cellular activities evaluation of a promising anticancer agent: EAPB0503. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 7(4), 155. [\[CrossRef\]](#)
 34. Zhao, Y.Q., Wang, L.P., Ma, C., Zhao, K., Liu, Y., Feng, N.P. (2013). Preparation and characterization of tetrandrine-phospholipid complex loaded lipid nanocapsules as potential oral carriers. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 4169. [\[CrossRef\]](#)
 35. Lamprecht, A., Bouligand, Y., Benoit, J.P. (2002). New lipid nanocapsules exhibit sustained release properties for amiodarone. *Journal of Controlled Release*, 84(1-2), 59-68. [\[CrossRef\]](#)
 36. Moura, R.P., Pacheco, C., Pêgo, A.P., des Rieux, A., Sarmiento, B. (2020). Lipid nanocapsules to enhance drug bioavailability to the central nervous system. *Journal of Controlled Release*, 322, 390-400. [\[CrossRef\]](#)
 37. Anton, N., Gayet, P., Benoit, J.P., Saulnier, P. (2007). Nano-emulsions and nanocapsules by the

- PIT method: an investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. *International Journal of Pharmaceutics*, 344(1-2), 44-52. [CrossRef]
38. Lamprecht, A., Benoit, J.P. (2006). Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition. *Journal of Controlled Release*, 112(2), 208-213. [CrossRef]
 39. Peltier, S., Oger, J.M., Lagarce, F., Couet, W., Benoît, J.P. (2006). Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. *Pharmaceutical Research*, 23(6), 1243-1250. [CrossRef]
 40. Lacoeyille, F., Garcion, E., Benoit, J.P., Lamprecht, A. (2007). Lipid nanocapsules for intracellular drug delivery of anticancer drugs. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 7(12), 4612-4617. [CrossRef]
 41. Heurtault, B., Saulnier, P., Benoit, J.P., Proust, J.E., Pech, B., Richard, J. (2011). *U.S. Patent No. 8,057,823*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
 42. Tsakiris, N., Papavasileiou, M., Bozzato, E., Lopes, A., Vigneron, A.M., Pr eat, V. (2019). Combinational drug-loaded lipid nanocapsules for the treatment of cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 569, 118588. [CrossRef]
 43. Zhai, Y., Zhao, L., Wang, Z., Zhai, G. (2016). Preparation and characterization of novel lipid nanocapsules of ropivacaine for transdermal delivery. *Drug Delivery*, 23(2), 619-628. [CrossRef]
 44. Saliou, B., Thomas, O., Lautram, N., Clavreul, A., Hureaux, J., Urban, T., Benoit, J.P., Lagarce, F. (2013). Development and in vitro evaluation of a novel lipid nanocapsule formulation of etoposide. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(2), 172-180. [CrossRef]
 45. Zhai, Y., Liu, M., Wan, M., Li, Y., Zhang, M., Zhai, G. (2015). Preparation and characterization of puerarin-loaded lipid nanocapsules. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15(4), 2643-2649. [CrossRef]
 46. Unicancer Web Site. From, http://www.unicancer.fr/sites/default/files/Enjeux_defis_developpement_formes_vectorielles_J_P_Benoit.pdf / Erişim tarihi: 10 Temmuz 2021
 47. Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Venier-Julienne, M.C., Proust, J.E., Phan-Tan-Luu, R., Beno t, J.P. (2003). The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(1), 55-61. [CrossRef]
 48. Roger, E., Lagarce, F., Benoit, J.P. (2011). Development and characterization of a novel lipid nanocapsule formulation of Sn38 for oral administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79(1), 181-188. [CrossRef]
 49. Briot, T., Roger, E., Lautram, N., Verger, A., Clavreul, A., Lagarce, F. (2017). Development and in vitro evaluations of new decitabine nanocarriers for the treatment of acute myeloid leukemia. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 8427. [CrossRef]
 50. Lamprecht, A., Bouligand, Y., Benoit, J.P. (2002). New lipid nanocapsules exhibit sustained release properties for amiodarone. *Journal of Controlled Release*, 84(1-2), 59-68. [CrossRef]
 51. Vakilzadeh, H., Varshosaz, J., Soghrati, S. (2021). Enhanced Solubility and Permeability of

- Naringenin Across Non-Everted Sacs of Rat Small Intestine by Lipid Nanocapsules. *Recent Patents on Nanotechnology*, 15(1), 55-69. [\[CrossRef\]](#)
52. Basu, S.M., Yadava, S.K., Singh, R., Giri, J. (2021). Lipid nanocapsules co-encapsulating paclitaxel and salinomycin for eradicating breast cancer and cancer stem cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 204, 111775. [\[CrossRef\]](#)
53. Ramadan, A., Lagarce, F., Tessier-Marteau, A., Thomas, O., Legras, P., Macchi, L., Saulnier, P., Benoit, J.P. (2011). Oral fondaparinux: use of lipid nanocapsules as nanocarriers and in vivo pharmacokinetic study. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 2941. [\[CrossRef\]](#)
54. Morille, M., Passirani, C., Dufort, S., Bastiat, G., Pitard, B., Coll, J.L., Benoit, J.P. (2011). Tumor transfection after systemic injection of DNA lipid nanocapsules. *Biomaterials*, 32(9), 2327-2333. [\[CrossRef\]](#)
55. Messaoudi, K., Saulnier, P., Boesen, K., Benoit, J.P., Lagarce, F. (2014). Anti-epidermal growth factor receptor siRNA carried by chitosan-transacylated lipid nanocapsules increases sensitivity of glioblastoma cells to temozolomide. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 1479. [\[CrossRef\]](#)
56. Vrignaud, S., Hureauux, J., Wack, S., Benoit, J.P., Saulnier, P. (2012). Design, optimization and in vitro evaluation of reverse micelle-loaded lipid nanocarriers containing erlotinib hydrochloride. *International Journal of Pharmaceutics*, 436(1-2), 194-200. [\[CrossRef\]](#)
57. Groo, A.C., Matougui, N., Umerska, A., Saulnier, P. (2018). Reverse micelle-lipid nanocapsules: a novel strategy for drug delivery of the plectasin derivate AP138 antimicrobial peptide. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 7565. [\[CrossRef\]](#)
58. Montigaud, Y., Ucakar, B., Krishnamachary, B., Bhujwalla, Z.M., Feron, O., Pr eat, V., Fabienne D., Gallez, B., Danhier, P. (2018). Optimized acriflavine-loaded lipid nanocapsules as a safe and effective delivery system to treat breast cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 551(1-2), 322-328. [\[CrossRef\]](#)
59. Vrignaud, S., Anton, N., Gayet, P., Benoit, J. P., Saulnier, P. (2011). Reverse micelle-loaded lipid nanocarriers: a novel drug delivery system for the sustained release of doxorubicin hydrochloride. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79(1), 197-204. [\[CrossRef\]](#)
60. Lollo, G., Matha, K., Bocchiardo, M., Bejaud, J., Marigo, I., Virgone-Carlotta, A., Dehoux T., Riviere, C., Rieu, J.P., Briançon, S., Perrier, T., Meyer, O., Benoit, J.P. (2019). Drug delivery to tumours using a novel 5-FU derivative encapsulated into lipid nanocapsules. *Journal of Drug Targeting*, 27(5-6), 634-645. [\[CrossRef\]](#)
61. Eldesouky, L.M., El-Moslemany, R.M., Ramadan, A.A., Morsi, M.H., Khalafallah, N.M. (2021). Cyclosporine Lipid Nanocapsules as Thermoresponsive Gel for Dry Eye Management: Promising Corneal Mucoadhesion, Biodistribution and Preclinical Efficacy in Rabbits. *Pharmaceutics*, 13(3), 360. [\[CrossRef\]](#)
62. Ashour, A.A., Ramadan, A.A., Abdelmonsif, D.A., El-Kamel, A.H. (2020). Enhanced oral bioavailability of Tanshinone IIA using lipid nanocapsules: formulation, in-vitro appraisal and pharmacokinetics. *International Journal of Pharmaceutics*, 586, 119598. [\[CrossRef\]](#)
63. Bapat, P., Ghadi, R., Chaudhari, D., Katiyar, S.S., Jain, S. (2019). Tocophersolan stabilized lipid

- nanocapsules with high drug loading to improve the permeability and oral bioavailability of curcumin. *International Journal of Pharmaceutics*, 560, 219-227. [\[CrossRef\]](#)
64. Roger, E., Lagarce, F., Benoit, J.P. (2009). The gastrointestinal stability of lipid nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, 379(2), 260-265. [\[CrossRef\]](#)
65. Lamprecht, A., Saumet, J.L., Roux, J., Benoit, J.P. (2004). Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, 278(2), 407-414. [\[CrossRef\]](#)
66. Amara, R.O., Ramadan, A.A., El-Moslemany, R.M., Eissa, M.M., El-Azzouni, M.Z., El-Khordagui, L.K. (2018). Praziquantel–lipid nanocapsules: an oral nanotherapeutic with potential *Schistosoma mansoni* tegumental targeting. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 4493. [\[CrossRef\]](#)
67. Varshosaz, J., Taymouri, S., Jahanian-Najafabadi, A., Alizadeh, A. (2018). Efavirenz oral delivery via lipid nanocapsules: formulation, optimisation, and ex-vivo gut permeation study. *IET Nanobiotechnology*, 12(6), 795-806. [\[CrossRef\]](#)
68. Gamboa, G.V.U., Pensel, P.E., Elissondo, M.C., Bruni, S.F.S., Benoit, J.P., Palma, S.D., Allemandi, D.A. (2019). Albendazole-lipid nanocapsules: optimization, characterization and chemoprophylactic efficacy in mice infected with *Echinococcus granulosus*. *Experimental Parasitology*, 198, 79-86. [\[CrossRef\]](#)
69. Hureaux, J., Lagarce, F., Gagnadoux, F., Rousselet, M.C., Moal, V., Urban, T., Benoit, J.P. (2010). Toxicological study and efficacy of blank and paclitaxel-loaded lipid nanocapsules after iv administration in mice. *Pharmaceutical Research*, 27(3), 421-430. [\[CrossRef\]](#)
70. Khalid, M.N., Simard, P., Hoarau, D., Dragomir, A., Leroux, J.C. (2006). Long circulating poly (ethylene glycol)-decorated lipid nanocapsules deliver docetaxel to solid tumors. *Pharmaceutical Research*, 23(4), 752-758. [\[CrossRef\]](#)
71. Rahali, Y., Saulnier, P., Benoit, J.P., Bensouda, Y. (2010). Incorporating vegetal oils in parenteral nutrition using lipid nanocapsules. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 20(6), 425-429. [\[CrossRef\]](#)
72. Huynh, N.T., Morille, M., Bejaud, J., Legras, P., Vessieres, A., Jaouen, G., Benoit, J.P., Passirani, C. (2011). Treatment of 9L gliosarcoma in rats by ferrociphenol-loaded lipid nanocapsules based on a passive targeting strategy via the EPR effect. *Pharmaceutical Research*, 28(12), 3189-3198. [\[CrossRef\]](#)
73. Lainé, A.L., Adriaenssens, E., Vessièrès, A., Jaouen, G., Corbet, C., Desruelles, E., Pigeon, P., Toillon, R.A., Passirani, C. (2013). The in vivo performance of ferrocenyl tamoxifen lipid nanocapsules in xenografted triple negative breast cancer. *Biomaterials*, 34(28), 6949-6956. [\[CrossRef\]](#)
74. Hureaux, J., Lacoëuille, F., Lagarce, F., Rousselet, M.C., Contini, A., Saulnier, P., Benoit, J.P., Urban, T. (2017). Absence of lung fibrosis after a single pulmonary delivery of lipid nanocapsules in rats. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 8159. [\[CrossRef\]](#)
75. Umerska, A., Mugheirbi, N.A., Kasprzak, A., Saulnier, P., Tajber, L. (2020). Carbohydrate-based Trojan microparticles as carriers for pulmonary delivery of lipid nanocapsules using dry powder inhalation. *Powder Technology*, 364, 507-521. [\[CrossRef\]](#)

76. Hureauux, J., Lagarce, F., Gagnadoux, F., Vecellio, L., Clavreul, A., Roger, E., Kempf, M., Racineux, J.L., Diot, P., Benoit, J.P., Urban, T. (2009). Lipid nanocapsules: ready-to-use nanovectors for the aerosol delivery of paclitaxel. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 73(2), 239-246. [\[CrossRef\]](#)
77. Umerska, A., Mouzouvi, C.R., Bigot, A., Saulnier, P. (2015). Formulation and nebulization of fluticasone propionate-loaded lipid nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 493(1-2), 224-232. [\[CrossRef\]](#)
78. Nguyen, H.T.P., Munnier, E., Perse, X., Vial, F., Yvergnaux, F., Perrier, T., Soucé, M., Chourpa, I. (2016). Qualitative and quantitative study of the potential of lipid nanocapsules of one hundred twenty nanometers for the topical administration of hydrophobic molecules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(10), 3191-3198. [\[CrossRef\]](#)
79. Zhai, Y., Yang, X., Zhao, L., Wang, Z., Zhai, G. (2014). Lipid nanocapsules for transdermal delivery of ropivacaine: in vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 471(1-2), 103-111. [\[CrossRef\]](#)
80. Varshosaz, J., Hajhashemi, V., Soltanzadeh, S. (2011). Lipid nanocapsule-based gels for enhancement of transdermal delivery of ketorolac tromethamine. *Journal of Drug Delivery*, 2011. [\[CrossRef\]](#)
81. Abdel-Mottaleb, M.M., Neumann, D., Lamprecht, A. (2011). Lipid nanocapsules for dermal application: a comparative study of lipid-based versus polymer-based nanocarriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79(1), 36-42. [\[CrossRef\]](#)
82. Hatahet, T., Morille, M., Shamseddin, A., Aubert-Pouëssel, A., Devoisselle, J.M., Bégu, S. (2017). Dermal quercetin lipid nanocapsules: Influence of the formulation on antioxidant activity and cellular protection against hydrogen peroxide. *International Journal of Pharmaceutics*, 518(1-2), 167-176. [\[CrossRef\]](#)
83. Hatahet, T., Morille, M., Hommos, A., Devoisselle, J.M., Müller, R.H., Bégu, S. (2018). Liposomes, lipid nanocapsules and smartCrystals®: A comparative study for an effective quercetin delivery to the skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 542(1-2), 176-185. [\[CrossRef\]](#)
84. El-Sheridy, N.A., Ramadan, A.A., Eid, A.A., El-Khordagui, L.K. (2019). Itraconazole lipid nanocapsules gel for dermatological applications: in vitro characteristics and treatment of induced cutaneous candidiasis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 181, 623-631. [\[CrossRef\]](#)
85. Formica, M.L., Legeay, S., Bejaud, J., Montich, G.G., Gamboa, G.V U., Benoit, J.P., Palma, S.D. (2020). Novel hybrid lipid nanocapsules loaded with a therapeutic monoclonal antibody–Bevacizumab–and Triamcinolone acetonide for combined therapy in neovascular ocular pathologies. *Materials Science and Engineering: C*, 119, 111398. [\[CrossRef\]](#)
86. Sun, R., Zhang, A., Ge, Y., Gou, J., Yin, T., He, H., Wang, Y., Zhang, G., Kong, J., Shang, L., Tao, X., Zhang, Y., Tang, X. (2020). Ultra-small-size Astragaloside-IV loaded lipid nanocapsules eye drops for the effective management of dry age-related macular degeneration. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 17(9), 1305-1320. [\[CrossRef\]](#)
87. Zhang, A., Sun, R., Ran, M., Deng, Y., Ge, Y., Zhu, Y., Tao, X., Shang, L., Gou, J., He, H., Yin, T., Wang, Y., Zhang, Y., Tang, X. (2020). A Novel Eyes Topical Drug Delivery System: CsA-

LNC for the Treatment of DED. *Pharmaceutical Research*, 37(7), 1-14. [\[CrossRef\]](#)

88. Abozaid, D., Ramadan, A., Barakat, H., Khalafallah, N. (2018). Acyclovir lipid nanocapsules gel for oromucosal delivery: A preclinical evidence of efficacy in the chicken pouch membrane model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 121, 228-235. [\[CrossRef\]](#)



KOZMETİK ÜRÜNLERDE GÖRÜLEN MİKROBİYOLOJİK KONTAMİNASYONLAR

MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION OF COSMETIC PRODUCTS

Ayşe ARAS¹ , Müjde ERYILMAZ^{2*} 

¹T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, Kozmetik Ürünler Dairesi, 06520,
Ankara, Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, 06560, Ankara,
Türkiye

ÖZ

Amaç: Kozmetik ürün; insan vücudunun epiderma, tırnaklar, kollar, saçlar, dudaklar ve dış genital organlar gibi dış kısımlarına; dişlere ve ağız mukozasına uygulanmak üzere hazırlanmış, tek veya temel amacı bu kısımları temizlemek, koku vermek, görünümünü değiştirmek ve/veya vücut kokularını düzeltmek ve/veya korumak veya iyi bir durumda tutmak olan bütün madde ve preparatları tanımlanmaktadır. Bu ürün grubu toplumda hemen her yaş grubundan bireyler tarafından kullanılmakta olup tüketicilere etkili, güvenli ve kaliteli bir şekilde ulaştırılmalıdır. Kozmetik ürünler, steril olmayan farmasötik ürünler grubunda yer almaktadırlar. Kozmetik ürünlerin içeriğinde yer alan su bazlı karışımlar, protein açısından zengin maddeler, bitkisel veya hayvansal hammaddeler mikrobiyal üreme için oldukça elverişlidir. Bu derlemede ülkemizde kozmetik ürünlerin mikrobiyolojik açıdan sahip olması gereken özellikler ve kozmetik ürünlerde görülen mikrobiyolojik kontaminasyonlar değerlendirilerek, kontaminasyonun önlenmesi için yapılması gerekenler gözden geçirilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: Yapılan çalışmalar kozmetik ürünlerin çoğunlukla tüketici tarafından kullanım sırasında kontaminasyona uğradığını göstermektedir. Ürünlerin son kullanma tarihi geçtikten sonra kullanılması, birden fazla kişi tarafından kullanılması, tükürükle ıslatılması, içine parmak ya da kontamine cisimlerin sokulması, hava ile temas halinde olması kullanım sırasındaki kontaminasyonun en önemli sebepleri olarak gösterilmektedir. Kozmetik ürünlerde sıklıkla kontaminasyona neden olan mikroorganizmalar; *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *S. epidermidis*, *Candida albicans* ve *Aspergillus sp.* olarak belirtilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal koruyucular, kozmetik ürünler, mikrobiyolojik kalite kontrolü, mikrobiyal kontaminasyon

ABSTRACT

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Müjde Eryılmaz
e-posta / e-mail: meryilmaz@ankara.edu.tr, Tel. / Phone: +90 312 203 31 85

Objective: *Cosmetic product; defines all substances and preparations which prepared to be applied to external parts of the human body such as epidermis, nails, hair, lips, and external genitalia; teeth and oral mucosa, whose sole or main purpose is to clean, smell, change their appearance, and/or correct and/or protect or keep these parts in good condition. This product group is used by individuals from almost every age group in society and should be delivered to consumers in an effective, safe, and high-quality way. Cosmetic products are included in the group of non-sterile pharmaceutical products. Water-based mixtures, protein-rich substances, vegetable or animal raw materials in the content of cosmetic products are suitable for microbial growth. In this review, the microbiological properties of cosmetic products in our country and the microbiological contaminations seen in cosmetic products were evaluated, and what should be done to prevent contamination was reviewed.*

Result and Discussion: *Studies have shown that cosmetic products are mostly contaminated during use by the consumer. The most important causes of contamination during use are the use of products after their expiration date, use by more than one person, wetting them with saliva, inserting fingers or contaminated drawings into them, and being in contact with air. Microorganisms that frequently cause contamination in cosmetic products are indicated as Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Enterobacter sp., Escherichia coli, Klebsiella pneumonia, S. epidermidis, Candida albicans, and Aspergillus sp.*

Keywords: *Antimicrobial preservatives, cosmetic products, microbial contamination, microbiological quality control*

GİRİŞ

Sağlık Bakanlığı'nın 30.03.2005 tarihli ve 25771 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan 5324 sayılı Kozmetik Kanunu'na göre: Kozmetik ürün; insan vücudunun epiderma, tırnaklar, kıllar, saçlar, dudaklar ve dış genital organlar gibi dış kısımlarına; dişlere ve ağız mukozasına uygulanmak üzere hazırlanmış, tek veya temel amacı bu kısımları temizlemek, koku vermek, görünümünü değiştirmek ve/veya vücut kokularını düzeltmek ve/veya korumak veya iyi bir durumda tutmak olan madde ve preparatları tanımlanmaktadır [1, 2]. Kozmetikler, Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi (FDA) tarafından kullanım amaçlarına göre insan vücudunu temizlemek, güzelleştirmek, çekici hale getirmek veya görünümünü değiştirmek amacıyla deri ve eklerine, ovalama, sürme, serpmeye ve sıkma şeklinde uygulanan maddeler olarak tanımlanmaktadır [3].

Toplumda hemen her yaş grubundan bireyler tarafından kullanılan kozmetikler, oldukça geniş ürün çeşitliliğine sahiptir. Bu ürünlerin birçoğu tüketiciler tarafından günlük olarak kullanılmaktadır. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'nun yayınladığı 19.04.2021 tarihli Kozmetik Ürünler Yönetmelik Değişikliği Taslak Metni'nde kozmetik ürünler; cilt bakım ürünleri, cilt temizleyici ürünler, vücut tüylerini uzaklaştırıcı ürünler, vücut tüylerini sarartıcı ürünler, vücut kokusunu ve/veya terlemesini düzenleyen ürünler, tıraş ve tıraş öncesi/sonrası ürünler, makyaj ürünleri, parfümler, güneş ürünleri ve güneşsiz bronzlaştırıcı ürünler, diğer cilt ürünleri, saç ve saç derisi bakım ve temizleme ürünleri, saç renklendirme için kullanılan ürünler, saç şekillendirici ürünler, diğer saç ve saç derisi ürünleri, tırnak cilası ve cila çıkarıcı ürünler, tırnak bakımı için kullanılan ürünler, tırnak güçlendirici ürünler, tırnak yapıştırıcısı çıkarıcı ürünler, diğer tırnak ve kütikül ürünleri, diş bakım ürünleri, ağız suları, ağız spreyleri, diş beyazlatıcılar, diğer ağız hijyen ürünleri genel başlıkları altında sınıflandırılmıştır. Kozmetik Ürün Kategorileri Tablo 1'de verilmiştir [4].

Tablo 1. Kozmetik Ürün Kategorileri [4]

Kozmetik Ürün Kategorileri		
CİLT ÜRÜNLERİ	Cilt Bakım Ürünleri	Yüz maskeleri dışındaki cilt bakım ürünleri Yüz maskesi Göz çevresi ürünleri Dudak bakım ürünleri El bakım ürünleri Ayak bakım ürünleri Vücut bakım ürünleri Dış genital bölge bakım ürünleri Kimyasal soyucu ürünleri Mekanik soyucu ürünleri Cilt rengini açıcı, aydınlatıcı ürünler Diğer cilt bakım ürünleri
	Cilt Temizleyici Ürünler	Sabunlar Banyo/duş ürünleri Makyaj çıkarıcı ürünler Dış genital bölge hijyen ürünleri Diğer cilt temizleyici ürünler
	Vücut Tüylerini Uzaklaştırıcı Ürünler	Kimyasal depilatuvarlar Fiziksel epilasyon ürünleri Vücut tüylerini uzaklaştıran diğer ürünler
	Vücut Tüylerini Sarartıcı Ürünler	Vücut tüy sarartıcı ürünleri
	Vücut Kokusunun ve/veya Terlemenin Düzenlenmesi	Ter önleyici etkili ürünler Ter önleyici etkili olmayan ürünler
	Tıraş ve Tıraş Öncesi/Sonrası Ürünler	Tıraş ürünleri Tıraş öncesi/sonrası ürünler Diğer tıraş ve tıraş öncesi/sonrası ürünler
	Makyaj Ürünleri	Fondöten Kapatıcı Diğer yüz makyaj ürünleri Maskara Göz farı Göz kalemi Göz konturunu sağlayan ürünler (eyeliner) Diğer göz makyaj ürünleri Ruj/dudak parlaticısı Ruj sabitleyici Diğer dudak makyaj ürünleri Vücut veya yüz boyaaları Diğer makyaj ürünleri
	Parfümler	Hidroalkolik parfümler Hidroalkolik olmayan parfümler
	Güneş Ürünleri ve Güneşsiz Bronzlaştırıcı Ürünler	Güneş öncesi ve güneş sonrası ürünler Güneşten koruma ürünleri Güneşsiz bronzlaştırıcı ürünler Diğer güneş ürünleri ve güneşsiz bronzlaştırıcı ürünler
	Diğer Cilt Ürünleri	Diğer cilt ürünleri

Tablo 1 (devamı). Kozmetik Ürün Kategorileri [4]

Kozmetik Ürün Kategorileri		
SAÇ VE SAÇ DERİSİ ÜRÜNLERİ	Saç ve Saç Derisi Bakım ve Temizleme Ürünleri	Şampuan Saç kremi Saç derisi ve saç kökleri bakım ürünleri Kepek önleyici ürünler Saç kaybını önleyici ürünler Diğer saç ve saç derisi bakım ve temizleme ürünleri
	Saç Renklendirmede Kullanılan Ürünler	Oksidatif saç boyaları Oksidatif olmayan saç boyaları Saç rengini açıcı ve boya çıkarıcı ürünler Diğer saç boya ürünleri
	Saç Şekillendirici Ürünler	Geçici saç şekillendirici ürünler Kalıcı saç şekillendirici ürünler Saç yatıştırıcı ve düzleştirici ürünler Diğer saç şekillendirici ürünler
	Diğer Saç ve Saç Derisi Ürünleri	Saçı güneşten koruyucu ürünler Diğer saç ve saç derisi ürünleri
TIRNAK VE KÜTİKÜL ÜRÜNLERİ	Tırnak Cilası ve Cila Çıkarıcı Ürünler	Tırnak cilası ve tırnak makyajı Tırnak cilası çıkarıcı Tırnak cilası inceltici Tırnak rengini açıcı ürünler Diğer tırnak cilası ve cila çıkarıcı ürünler
	Tırnak Bakım/Tırnak Güçlendirici Ürünler	Tırnak bakım ürünleri Tırnak güçlendiriciler Diğer tırnak bakım/tırnak güçlendirici ürünler
	Tırnak Yapıştırıcısı Çıkarıcı Ürünler	Tırnak yapıştırıcısı çıkarıcılar
	Diğer Tırnak ve Kütikül Ürünleri	Kütikül çıkarıcılar / yumuşatıcılar Tırnak yapılandırıcı ürünler Diğer tırnak ve kütikül ürünleri
AĞIZ HİJYEN ÜRÜNLERİ	Diş Bakım Ürünleri	Diş macunu Diş temizleme tozu/tuzu Diğer diş bakım ürünleri
	Ağız Suları / Spreyleri	Ağız çalkalama suları Nefes tazeleyici spreylere/ağız spreylere Diğer ağız çalkalama suları /nefes tazeleyici spreylere/ağız spreylere
	Diş Beyazlatıcılar	Diş beyazlatıcılar
	Diğer Ağız Hijyen Ürünleri	Diğer ağız hijyen ürünleri

Etkili, güvenli ve kaliteli bir şekilde topluma ulaştırılması gereken kozmetik ürünler, üretici tarafından öngörülebilir şartlar altında uygulandığında veya ürünün sunumu, etiketlenmesi, kullanımına dair açıklamalara veya üretici tarafından sağlanan bilgiler dikkate alınarak önerilen kullanım şartlarına göre uygulandığında, insan sağlığına zarar vermeyecek nitelikte olmak zorundadır [1, 2, 5].

Kozmetik ürünler, steril olmayan farmasötik ürünler grubunda yer almaktadırlar. Bu ürünlerin yapılarında bulunan karbon ve azot kaynakları, mineraller, üreme faktörleri, uygun asidik ortam ve nem mikrobiyal üreme için uygun ortam oluşmasını sağlar. Kozmetik ürünlerin mikrobiyolojik kontaminasyonları hem tüketici sağlığı açısından risk oluşturması hem de üründe meydana gelebilecek değişiklikler (koku ve gaz oluşumu, renk ve viskozite değişiklikleri vb.) nedeniyle ekonomik kayba neden olması açısından önem taşımaktadır. Kozmetik ürünlerin mikrobiyolojik kontaminasyonu, üretim, doldurma, depolama aşamalarında veya tüketici tarafından kullanım esnasında gerçekleşebilmektedir. Üretim aşamasındaki kontaminasyon, ham madde, su veya diğer yardımcı maddeler aracılığı ile gerçekleşebilir. Bununla birlikte uygun olmayan üretim ortamı ve koşulları, cihaz, ekipman, personel de kontaminasyona neden olabilmektedir. Kontaminasyon ambalajlama, nakliye, depolama süreçlerinde gerçekleşebileceği gibi özellikle aynı ürünün birden fazla tüketici tarafından kullanılması sonucunda da görülebilmektedir. Kozmetik ürünlerin içeriğinde yer alan su bazlı karışımlar, protein açısından zengin maddeler, bitkisel veya hayvansal hammaddeler mikrobiyal üremeye oldukça elverişlidir [5-9].

Kozmetik üreticisi, İyi İmalat Uygulamaları (GMP) ve Mikrobiyolojik Kalite Yönetimine uygun olarak üretimde kullanılacak cihaz ve malzemelerin temiz, ürünlerin patojen mikroorganizmalardan arındırılmış olmasını sağlamalıdır. Bunun için özel temizleme, sanitasyon ve kontrol prosedürlerini tanımlayarak takip etmelidir. Bunun yanında prosedürler, hammaddelerin, dökme/yığın (bulk) ve bitmiş ürünlerin, paketlemede kullanılan malzemelerin, personelin, ekipmanın, hazırlık ve depolama odalarının mikrobiyolojik kontrolünü de içermelidir [5].

Kozmetik ürünün açıldıktan sonra son kullanma tarihine kadar tüketici için mikrobiyal açıdan güvenilirliğinin sağlanması, kalitesinin ve özelliklerinin korunması gerekmektedir. Mikrobiyal kontaminasyonu önlemek ve ürün kalitesinin devamını sağlamak için düşük mikrobiyolojik riskli ve tek kullanımlık veya açılmayan ürünler haricindeki ürün formülasyonlarına koruyucu eklenmelidir. Koruyucu, kozmetik üründe bakteriyel ve fungal üremeyi önlemek için kullanılan doğal veya sentetik kökenli bileşen ya da bileşenlerin karışımıdır. Koruyucunun gösterdiği antimikrobiyal etkinlik, ürünün beklenen raf ömrü artı kullanım süresine eşdeğer olacak şekilde ve geniş spektrumlu olmalıdır. Bununla birlikte üründe kullanılacak olan koruyucu maddelerin formülasyonda yer alan diğer maddelerle uyumlu olması, tüketici üzerine alerjik, toksik ve tahriş edici etkilerinin bulunmaması ve mikroorganizmanın koruyucu sisteme adaptasyonu ve direnç geliştirmesini önleyecek nitelikte olması gerekmektedir [6, 7, 10].

Kozmetik ürünlerde kullanılan koruyucular fenolik yapıdaki koruyucular (parabenler, fenoksietanol, benzil alkol vb.), formaldehit ve formaldehit salan koruyucular (imidazolidinil üre, diazolidinil üre vb.), halojenize koruyucular (triklosan, klorfenezin, metilkloroizotiazolinon vb.), halojen olmayan izotiyazolinonlar (metilizotiyazolinon, benzisotiazolinon vb.) ve organik asitler

(benzoik asit, sorbik asit vb.) olmak üzere genel olarak 5 grup altında sınıflandırılabilir. Bunların dışında nitrojen bileşenleri, ağır metal türevleri, inorganik bileşenler de koruyucu olarak kullanılabilir. Günümüzde antimikrobiyal etkinliği artırmak ve formülasyona adaptasyonu kolaylaştırmak için kombine şekildeki koruyucu bileşenler üretimde daha çok tercih edilmektedir. Biyolojik olarak aktif kimyasallar olan koruyucuların, antimikrobiyal etki gösterirken tüketici üzerinde zararlı etkileri de söz konusu olabileceğinden, kozmetiklerde kullanılması uygun olan maddeler yönetmelik ve yasalarla düzenlenmiştir. Ülkemizde, kozmetik ürünlerde kullanılmasına izin verilen koruyucuların listesi Kozmetik Ürünler Yönetmeliği Ek-V'te yer almaktadır. Koruyucu seçimi, ürün cinsi ve kullanım şekli göz önünde bulundurularak, belirlenen kriterlere uygun yapılmalıdır [6, 7, 11, 12].

Ülkemizde kozmetik ürün bildirim esnasında Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK) tarafından istenen ve uzmanlarca kontrolü yapılan belgeler arasında Ürün Güvenlilik Değerlendirme Raporu da yer almaktadır. Bu rapor ürün bileşenlerinin toksikolojik karakteri, kimyasal yapısı ve maruz kalma seviyeleri, ürünün kullanıma sunulduğu hedef kitlenin veya ürünün uygulanacağı bölgenin belirgin maruziyet özellikleri göz önünde bulundurularak bitmiş üründe yapılan değerlendirmeyi sunmaktadır. Kozmetik ürünlerin mikrobiyolojik kalitesine ilişkin bilgi, koruyucu sistemin etkinliğinin doğrulanması ve normal koşullar altında depolanan kozmetik ürünün belirtilen minimum dayanma süresinin ve bitmiş ürünün açıldıktan sonra kullanım süresinin doğrulanması ürün güvenliği açısından önemlidir. Rapor içeriğinde kozmetik ürüne ait mikrobiyolojik kalite testleri ve koruyucu etkinlik testleri sonuçlarının da yer alması zorunludur [5].

TİTCK tarafından yayınlanan “*Kozmetik Ürünlerde Güvenlilik Değerlendirmesine İlişkin Kılavuz Sürüm 3.0*”de kozmetik ürünlerin mikrobiyolojik açıdan sahip olması gereken özellikler bildirilmiştir. Bu kılavuzda kozmetik ürünler, mikrobiyolojik kalite kontrolü açısından iki kategori altında gruplandırılmış olup, özellikle göz çevresinde, mukoza zarlarında, hassas deride, üç yaş altı çocuklarda, yaşlılarda veya riskli bağışık yanıt gösteren kişilerde kullanılacak olan kozmetik ürünlerin mikrobiyolojik spesifikasyonlarına dikkat çekilmiştir [5].

Kategori 1: Göz bölgesinde ve mukoza zarlarında kullanılmak üzere, 3 yaşın altındaki çocuklar için özel olarak tasarlanmış ürünler.

Kategori 2: Diğer ürünler.

TİTCK tarafından yayınlanan kılavuzda EN ISO 17516 Standardına göre kozmetik ürünlerdeki mikrobiyolojik limit değerleri Tablo 2'deki gibi verilmiştir.

Kozmetik ürünler mikrobiyolojik duyarlılıkları göz önüne alınarak üç gruba ayrılmaktadır [5, 8].

- **Düşük mikrobiyolojik riskli ürünler:** Bu grupta yer alan ürünler için bitmiş üründe tarama-zorlama testi (koruyucu etkinlik testi, challenge test) veya mikrobiyolojik kalite testlerinin yapılması gerekli değildir. Bilimsel doğrulama sağlanması yeterlidir. Bu grupta yer alan ürünlere alkol içeriği

>%20 olan ürünler, organik çözeltilere dayalı ürünler, ve yüksek/düşük pH değerlerine sahip ürünler örnek olarak verilebilir.

- **Tek kullanımlık ürünler ve açılmayan ürünler:** Bu grupta yer alan ürünler için bitmiş üründe sadece mikrobiyolojik kalite testinin yapılması gereklidir.

- **Diğer ürünler:** Bitmiş üründe hem tarama-zorlama testinin hem de mikrobiyolojik kalite testinin yapılmasının gerekli olduğu tüm diğer ürünler bu grupta yer alır.

Tablo 2. Kozmetik Ürünlerdeki Mikrobiyolojik Limit Değerleri [5]

Mikroorganizma Tipi	Kategori 1	Kategori 2
Toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı (Bakteri+küf+maya)	$\leq 1 \times 10^2$ cfu/ g veya ml ^a	$\leq 1 \times 10^3$ cfu/ g veya ml ^b
<i>Escherichia coli</i>	1 g ve ml de bulunmamalı	1 g ve ml de bulunmamalı
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 g ve ml de bulunmamalı	1 g ve ml de bulunmamalı
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 g ve ml de bulunmamalı	1 g ve ml de bulunmamalı
<i>Candida albicans</i>	1 g ve ml de bulunmamalı	1 g ve ml de bulunmamalı
*Plak sayım yönteminin doğal değişkenliği nedeniyle, USP-Amerikan Farmakopesi Bölüm 61 veya EP- Avrupa Farmakopesi Bölüm 2.6.12 ye göre, **Sonuçların yorumlanması, a > 200 CFU / g veya ml, b > 2000 CFU / g veya ml ise sonuçlar sınır dışı kabul edilir. ***Sabouraud Dekstroz agarında bakteri kolonileri tespit edildiğinde, antibiyotik içeren Sabouraud Dekstroz agar kullanılabilir.		

Kozmetik ürünün depolama ve kullanım sürecinde mikrobiyolojik stabilitesinin sağlanması amacıyla, ürün formülasyonunda yer alan koruyucunun etkinliği değerlendirilmelidir. Koruyucunun etkinliği tarama- zorlama testi (challenge test) aracılığı ile değerlendirilebilir. Bu test, ürünün üretiminden normal depolama ve kullanım koşullarında tüketilmeye kadar, bozulma veya kontamine olma olasılığına karşı, formülde yer alan koruyucu(lar) tarafından korunabileceğini göstermesi nedeniyle bütün kozmetikler için yapılmalıdır. Tarama-zorlama testi, bitmiş ürün formülünün yapay kontaminasyona maruz bırakıldıktan sonra mikrobiyal kontaminasyon riskinin değerlendirilmesi esasına dayanır. Testlerin tekrarlanabilirliğinin sağlanması amacıyla kullanılacak mikroorganizmalar; standart kültür koleksiyonlarında yer alan *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ve *Aspergillus brasiliensis* suşlarıdır. Bu suşlara ek olarak spesifik bir ürünü kontamine etme riski bulunan başka suşlarda teste dahil edilebilir [13].

Kozmetik ürünlerin mikrobiyolojik kalite kontrolü yapılırken, testlerin güvenilirliği için bitmiş ürün içeriğinde yer alan koruyucuların antimikrobiyal etkisinin uygun nötralizan ajanlar kullanılarak nötralize edilmesi gerekmektedir. Seçilecek olan nötralizan ürün içerisindeki tüm koruyucu maddeleri inaktive edebilmeli ve testte kullanılan tüm mikroorganizmalara karşı toksik etkili olmamalıdır. Avrupa Farmakopesi 2.6.12'ye göre glutaraldehit ve civa bileşikleri için sodyum bisülfid; sorbatlar ve aldehitler için dilüsyon; kuaterner amonyum bileşikleri, parabenler ve iyodinler için saponin, lesitin, polisorbata 80; civa için tiyoglikolat; halojenler için tiyosülfat nötralize edici ajanlar olarak kullanılabilir. Ayrıca parabenler, fenoksietanol, feniletanol için lesitin, polisorbata 80; kuaterner amonyum bileşikleri ve katyonik yüzey aktif maddeler için lesitin, saponin, polisorbata 80, sodyum dodesil sülfat; aldehitler için

glisin, histidin; oksitleyici maddeler için sodyum tiyosülfat kullanılarak antimikrobiyal etki ortadan kaldırılabılır [14, 15].

Kozmetik Ürünlerde Görülen Mikrobiyolojik Kontaminasyonlar

Hijyenik kurallar göz önünde bulundurularak, GMP'ye uygun olarak üretilmesi gereken kozmetik ürünler, formülasyonlarında yer alan organik ve inorganik maddeler nedeniyle mikroorganizmaların çoğalmasında için uygun ortamlar oluşturmaktadır. Günümüzde özellikle inorganik kimyasal içerikli ürünlerden çok, organik içerikli doğal ürünlere eğilimin olması ve mikroorganizmaların bitkisel ve hayvansal içerikli bu organik ortamlarda kolaylıkla çoğalabileceği ihtimali kontaminasyonun önemine dikkat çekmektedir [5, 8]. Kozmetik ürünlerin mikroorganizmalarla kontaminasyonu, ilk olarak 1946 yılında Yeni Zelanda'da *Clostridium tetani* ile kontamine olmuş talk pudrasının bebeklerde kullanımı sonucu meydana gelen ölümler ile fark edilmiştir [16]. İlerleyen yıllarda yapılan birçok araştırma kozmetiklerin çeşitli kaynaklardan gelen çok farklı mikroorganizmalarla kontamine olabileceklerini göstermiştir [9, 17-21].

Birleşik Krallık'ta yapılan bir çalışmada kullanılmış ruj (96), dudak parlaticısı (107), eyeliner (92) ve maskarlarda (93) mikrobiyolojik kontaminasyon varlığı araştırılmış ve kontaminasyona neden olan mikroorganizmalar tanımlanmıştır. Rujlarda *P. fulva* (2), *P. monteili* (1), *Citrobacter freundii* (1); dudak parlaticılarında *S. haemolyticus* (1), *S. cohnii* (1), *S. saprophyticus* (2), *S. capitis* (2), *S. pasteurii* (1), *Micrococcus luteus* (1), *Bacillus litoralis* (1), *P. putida* (1), *P. monteili* (3), *P. fulva* (2), *Lactobacillus* (1), *Citrobacter freundii* (1), *C. glabrata* (1); eyeliner'larda *Cryptococcus diffluens* (1), *Micrococcus luteus* (1), *Burkholderia vietnamiensis* (1), *Bacillus muralis* (1), *S. saprophyticus* (1), *S. capitis* (2), *S. hominis* (2), *S. haemolyticus* (2), *Escherichia coli* (2), *Arthrobacter roseus* (1); maskarlarda *Pluralibacter gergoviae* (2), *S. saprophyticus* (1) türleri kontaminant mikroorganizmalar olarak saptanmıştır [9].

RAPEX (Avrupa Birliği Hızlı Uyarı Bilgi Sistemi) sistemi üzerinde 2005-2018 yılları arasında bildirilen kozmetik ürünlerde mikrobiyolojik kontaminasyon verilerinin analiz edildiği çalışmada, kontamine olduğu için geri çağrılan 104 adet kozmetik ürün olduğu bildirilmiştir. Bu ürünlerin 32 tanesi cilt temizleme ürünü, 32 tanesi cilt bakım ürünü, 21 tanesi saç ve saç derisi ürünü, 8 tanesi makyaj ürünü, 1 tanesi deodorant ve geri kalan 10 tanesi de çeşitli kozmetik ürünler olarak belirtilmiştir. Ürünlerin 20 tanesinin çocuklara yönelik olduğu rapor edilmiştir. Kontaminasyona çoğunlukla Gram negatif bakterilerin (*P. aeruginosa* (30), *Enterobacter gergoviae* (8), *Pseudomonas* sp. (6), *Enterobacter cloacae* (4), *Burkholderia cepacia* (3), *Klebsiella pneumoniae* (2), *Achromobacter xylosoxidans* (1), *Burkholderia* sp. (1), *Citrobacter freundii* (1), *K. oxytoca* (1), *Pantoea agglomerans* (1), *Pantoea* sp. (1), *P. putida* (1), *Rhizobium radiobacter* (1), *Serratia marcescens* (1) neden olduğu görülmüştür. Kontaminasyon nedeni olarak Gram pozitif bakterilerden *S. aureus* (4), *Bacillus firmus* (1),

Enterococcus faecium (1), *Enterococcus* sp. (1) türleri tanımlanmıştır. Mantarlardan *C. albicans* 2 üründe saptanmıştır. Kontamine olan 45 üründeki etken ise tanımlanamamıştır [21].

Ülkemizde yapılan bir çalışmada kullanılmış 500 kozmetik ürün (el ve yüz kremi, güneş kremi, diş macunu, el ve vücut losyonu, tonik, maske, serum, vücut yağı, saç ürünleri, ruj, maskara, temizleyici jel, fondöten, makyaj kalemleri) mikrobiyolojik kontaminasyon açısından incelenmiş ve bu ürünlerin 101 tanesinde bakteriyel kontaminasyon tespit edilmiştir. Kontaminasyona neden olan bakteriler *S. epidermidis* (47), *S. hominis* (17), *E. coli* (16), *K. pneumoniae* (11), *S. aureus* (6) ve *P. aeruginosa* (4) olarak tanımlanmıştır [22]. Türkiye’de yapılan bir başka çalışmada farklı ambalaj tiplerinde bulunan 127 adet (43 tanesi hiç açılmamış-84 tanesi kullanılmış) kozmetik ürün (krem, losyon, temizleme losyonu, tonik) mikrobiyolojik kontaminasyon yönünden incelenmiştir. En fazla kontaminasyon kavanoz ve tüp ambalajlı ürünlerde görülürken, sprelerin kontaminasyon açısından daha güvenli olduğu bildirilmiştir. Kullanılmamış ve kullanılmış ambalaj grupları içinde en yüksek kontaminasyon oranına sahip olan ambalaj grubunun kavanozlar olduğu belirtilmiştir. Kullanılmamış kozmetik ürün örneklerinin %18,60’ının bakterilerle, %2,33’ünün mayalarla kontamine olduğu, kullanılmış örneklerin %47,62’sinin bakterilerle, %5,95’inin ise mayalarla kontamine olduğu saptanmıştır [23].

Ibegbulam-Njoku ve Chijioke-Osuji (2016), çalışmalarında Nijerya’da üretilen sabun (6), vücut kremi (5), saç kremi (4), roll-on deodorant (2) ve pudra (3)’dan oluşan yirmi farklı ticari kozmetik ürünü mikrobiyolojik kontaminasyon açısından incelemişlerdir. Test edilen kozmetik ürünlerde kontaminant olarak en çok *P. aeruginosa* ve *S. aureus* türleri saptanmıştır. Bunların dışında *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Salmonella* sp., *Proteus vulgaris*, *C. albicans*, *Aspergillus niger*, *A. flavus* kontaminasyona neden olan diğer mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır [24].

Bebek bakımı için kullanılan ürünlerin (vücut losyonu, şampuan, bebek yağı, vücut şampuanı ve sabunu) mikrobiyolojik kalitesinin araştırıldığı bir çalışmada *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp. ve *E. coli* kontaminasyona neden olan bakteriler olarak bulunmuştur. Ürünlerin üretim sürecinde veya uygun olmayan saklama koşulları nedeniyle kontaminasyona uğradığı düşünülmüştür [25].

Ticari olarak satın alınan ve kullanılmamış nemlendirici losyon, BB kremler ile yapılan bir çalışmada *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* ve *A. brasiliensis* kontaminasyona neden olan mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır [26].

Yapılan çalışmalar kozmetik ürünlerin çoğunlukla tüketici tarafından kullanım sırasında kontaminasyona uğradığını göstermektedir. Ürünlerin etiketinde belirtilen son kullanma tarihinden uzun süre kullanılması, birden fazla kişi tarafından kullanılması, tükürükle ıslatılması, içine parmak ya da kontamine cisimlerin sokulması, hava ile temas halinde olması, şampuan, duş jeli gibi ürünlerin su ile seyreltilmesi sonucu koruyucu etkinliğinin değişmesi, ambalajdan ambalaja aktarım kullanım sırasındaki kontaminasyonun en önemli sebepleridir [9, 27]. Giacomel ve ark. (2013), yaptıkları

araştırmada makyaj ürünlerinin tüketicilerin %97,9'u tarafından son kullanma tarihleri geçmiş olsa bile kullanılmaya devam edildiğini saptamışlardır. Son kullanma tarihi geçmesine rağmen en çok kullanılmaya devam edilen ürün maskara olarak bildirilmiştir. Maskaralarda kontamint olarak ilk sırada *S. aureus* (%79) tanımlanırken, *P. aeruginosa* (%13) ikinci sırada yer almıştır [17].

Skowron ve ark. (2017), son kullanma tarihi geçmemiş ve sadece bir kişi tarafından kullanılmış, son kullanma tarihi geçmemiş ve birden fazla kişi tarafından kullanılmış, son kullanma tarihi geçtikten sonra kullanılmış olmak üzere üç farklı kozmetik ürün grubunu mikrobiyolojik kontaminasyon açısından incelemişlerdir. Birden fazla kişi tarafından kullanılan kozmetik ürünlerin kontaminasyon oranının, yalnızca bir kişi tarafından kullanılanlardan daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte en fazla kontaminasyonun son kullanma tarihi geçtikten sonra kullanılan ürünlerde olduğunu belirtmişlerdir. Kozmetik ürünlerde kontaminasyona neden olan mikroorganizmalar, *Staphylococcus* sp., *P. aeruginosa*, *Aspergillus* sp. ve *Penicillium* sp. olarak tanımlanmıştır [28].

Su içeriği fazla olan kozmetik ürünlerin kullanım sırasında kontaminasyona uğraması durumunda mikrobiyal üremeye daha elverişli oldukları bildirilmektedir [18, 29, 30]. Yapılan çalışmalar kozmetik ürünlerde sıklıkla kontaminasyona neden olan mikroorganizmaların *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Enterobacter* sp., *E. coli*, *K. pneumonia*, *S. epidermidis*, *C. albicans*, *Aspergillus* sp. olduğunu göstermektedir. Kontaminasyona neden olan bazı mikroorganizmalar, hidrolitik enzimleri sayesinde üründe bulunan bazı maddeleri metabolize ederler. Bunun sonucunda ürünün yapısında çeşitli değişiklikler görülebilir. Bunlar koku veya gaz oluşumu, viskozite ve renk değişiklikleri, tat değişiklikleri, bulanıklık, çökelti, zar oluşumu şeklinde ortaya çıkabilir [8, 18, 20, 21, 31]. Sağlam deri ve mukoz membranlar mikroorganizmalar için bariyer görevi görürler. Çeşitli nedenlerle bu yapıların zarar görmesi ve bütünlüğünün bozulması mikroorganizmaların vücuda girişini sağlar. Kozmetik ürünlerde kontaminant olarak saptanan pekçok mikroorganizma türünün patojen olduğu ve ciddi enfeksiyonlara neden olabileceği bilinmektedir [18, 29, 32]. Kozmetiklerde kontaminasyona en sık neden olan mikroorganizmalardan olan *P. aeruginosa* toprak ve su başta olmak üzere doğada yaygın olarak bulunur. Özellikle bağışık yetmezliği olan kişilerde solunum yolu, idrar yolu, yara, yanık enfeksiyonları, menenjit ve septisemi gibi ciddi enfeksiyonlara neden olabilmesi açısından önemli bir fırsatçı patojendir. Antimikrobiallere karşı kolaylıkla direnç kazanabilmesi nedeniyle tedavisinde sorun yaşanan hastane enfeksiyonu etkenleri arasında sıralanmaktadır [32, 33]. Reid ve Wood (1979), *P. aeruginosa* ile kontamine olmuş maskara kullanımı sonucu 47 yaşındaki bir kadında kornea ülseri geliştiğini bildirmişlerdir [34]. Bir başka çalışmada maskara kullanımı sırasında korneada çizikler oluşabileceği ve bu çizikler sebebi ile genç bir kızda *P. aeruginosa*'nın etken olduğu kornea ülseri görüldüğü belirtilmiştir [35]. Birçok *Staphylococcus* türü insanların cilt ve mukozalarında normal flora üyesi olarak bulunur. Toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlardan sıklıkla izole edilen *S. aureus*, folikülit, impetigo gibi deri enfeksiyonlarından toksik şok sendromu, pnömoni, osteomyelit, endokardit,

menenjit ve sepsis gibi mortalite oranı yüksek, ciddi enfeksiyonlara yol açabilen fırsatçı bir patojendir [36]. Koagülaz negatif stafilokoklar arasında gruplandırılan *S. epidermidis*, insan vücudunun dış ortamlarla temas eden yüzeylerinde özellikle koltuk altı, baş ve burun deliklerinde bulunur. Geçmiş yıllarda klinik örneklerden izole edildiğinde kontaminasyon olarak değerlendirilen bu bakteri, günümüzde özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda, hastane enfeksiyonlarına en sık neden etkenlerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu bakteriler çeşitli yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturarak antimikrobiallere direnç gösterirler. Kalp kapak endokarditleri, intravasküler kateter enfeksiyonları, serebrospinal şant enfeksiyonları, vasküler greft enfeksiyonları, prostetik eklem enfeksiyonları ve periton diyaliz kateterleri ilişkili peritonitler neden oldukları enfeksiyonlar arasında yer almaktadır [37]. *S. aureus* ve *S. epidermidis* türleri maskara, göz kalemi ve yüz pudralarında kontaminasyona neden olmaktadır. Kozmetik ürünlerin *S. aureus* ile kontaminasyonu, konjonktivit ve impetigo gibi hastalıklara neden olabilmektedir [9, 18, 28]. Bebek ürünlerinin *S. aureus* ile kontaminasyonu, bu türün ürettiği eksfoliyatif toksinler nedeniyle stafilokoksik haşlanmış deri sendromu oluşumuna neden olabilmektedir [28]. Kozmetiklerde sıklıkla kontaminasyona neden olduğu bildirilen bir diğer bakteri grubu Enterobacter'lerdir. Enterobacter türleri doğada su ve toprakta, insan ve hayvan dışkılarında doğal olarak bulunan fırsatçı patojenlerdendir. Kozmetik kalite kontrol laboratuvarları tarafından yapılan analizlerde *Enterobacter gergoviae* yeni üretilmiş kozmetiklerden veya bozulmuş ürünlerden izole edilerek, tanımlanmıştır. *E. gergoviae* kozmetiklerde koruyucu olarak kullanılan parabenlere doğal dirençli olup, kontaminasyonlarıyla ilişkili kozmetiklerde kontaminasyon kaynakları genellikle mineçiçeği, lavanta, melek otu, portakal ve ölmez otu gibi bitki özleri olarak bildirilmiştir. Piyasadan toplatılan ürünler üzerine yapılan bir çalışmada *E. gergoviae*, kozmetik ürünlerin geri çekilmesiyle ilgili olarak en yüksek prevalansa sahip Gram-negatif bakterilerden biri olarak yer almıştır [38]. Enterobacteriaceae familyası içinde yer alan *E. coli* ve *K. pneumoniae* türleri doğada yaygın olarak bulunurlar. İnsanlarda normal bağırsak florası üyesi olan *E. coli*'nin yiyecek ve sularda saptanması fekal bulaşın göstergesi olarak kabul edilmektedir. *E. coli* tipleri insanlarda idrar yolu enfeksiyonu, ishal, peritonit, mastit, pnömoni, septisemi gibi çok çeşitli enfeksiyonlara neden olabilmektedir. *K. pneumoniae* insanlarda üst solunum yolu ve dışkı florasında yer alan fırsatçı bir patojendir. Hem toplum kaynaklı enfeksiyonlardan hem de tedavisinde sorun yaşanan hastane enfeksiyonlarından etken olarak izole edilmesi nedeniyle önemlidir. Neden olduğu başlıca enfeksiyonlar üriner sistem enfeksiyonu, pnömoni, yumuşak doku enfeksiyonları, menenjit, endoftalmi, piyojenik karaciğer apsisi, bakteriyemi olarak sıralanabilir. Kozmetik ürünlerde *E. coli* ve diğer Enterobacteriaceae üyelerinin bulunmaması gerekmektedir. [31, 39, 40]. El kremleri ve losyonlardan sıklıkla izole edilen mantarlar olan *C. albicans* ve *A. brasiliensis* türlerinin, deri ve mukoz membranların yanı sıra saç ve tırnaklarda da enfeksiyonlara neden oldukları bildirilmiştir [28].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Kozmetik ürünler formülasyonlarında yer alan karbonhidratlar, aminoasitler, mineraller, yağ asitleri, alkoller, steroidler, peptidler, vitaminler, bitkisel hammaddeler, üreme faktörleri ve su nedeniyle mikroorganizmaların üremesi için uygun ortamlar oluşturmaktadırlar. Steril olmayan farmasötik ürünler grubunda yer alan kozmetiklerin; tüketicilere etkili, güvenli ve kaliteli bir şekilde ulaştırılması gerekmektedir. Bu durum ülkemizde TİTCK tarafından yayımlanan mevzuatla güvence altına alınmıştır.

Kozmetik ürünlerin mikroorganizmalarla kontaminasyonu, hem tüketici sağlığı açısından risk oluşturması hem de ekonomik kayba neden olması açısından önemlidir. Mikrobiyolojik kontaminasyon üretim, doldurma, depolama aşamalarında veya tüketici tarafından kullanım sırasında meydana gelebilmektedir. Yapılan çalışmalar kozmetik ürünlerin çoğunlukla tüketici tarafından kullanım sırasında kontaminasyona maruz kaldığını göstermektedir. Ürünlerin etiketinde belirtilen son kullanma tarihi geçtikten sonra kullanılması, birden fazla kişi tarafından kullanılması, tükürükle ıslatılması, içine parmak ya da kontamine cisim sokulması, hava ile temas halinde olması kullanım sırasında meydana gelen kontaminasyonun en önemli nedenleri olarak gösterilmektedir. Kozmetik ürünlerde sıklıkla kontaminasyona neden olan mikroorganizmalar *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Enterobacter* sp., *E. coli*, *K. pneumonia*, *S. epidermidis*, *C. albicans*, *Aspergillus* sp. olarak bildirilmektedir.

Kozmetik ürünlerde mikrobiyolojik kontaminasyonun önüne geçebilmek için hammaddeden başlayarak gerekli mikrobiyolojik kontroller yapılmalı, üretim hijyenik koşullar altında GMP kurallarına uygun olarak gerçekleştirilmelidir. Kontaminasyon riski bulunan ürünlere, ürünü beklenen raf ömrü artı kullanım süresine eşdeğer olacak şekilde koruyabilecek, etki spektrumu geniş, tüketici üzerine alerjik, toksik ve tahriş edici etkileri bulunmayan, mevzuata uygun olarak seçilen koruyucu maddeler ilave edilmelidir. Üretim sonrasında ürünün stabilite testleri ile raf ömrü ve açıldıktan sonraki kullanım süresi belirlenmeli, ürünün mikrobiyolojik duyarlılık sınıfına göre mikrobiyolojik kalite testleri ve koruyucu etkinlik testleri yapılarak, mevzuatta belirtilen kriterlere uygunluğu kanıtlanmalıdır.

YAZAR KATKILARI

Kavram: A.A., M.E.; Tasarım: A.A., M.E.; Denetim: A.A., M.E.; Kaynaklar: A.A., M.E.; Malzemeler: -; Veri toplama ve/veya işleme: -; Analiz ve/veya yorumlama: A.A., M.E.; Literatür taraması: A.A., M.E.; Makalenin yazılması: A.A., M.E.; Kritik inceleme: A.A., M.E.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Kozmetik Kanunu, Resmî Gazete Tarihi: 30.03.2005, Sayı: 25771, Kanun Numarası: 5324.
2. Kozmetik Yönetmeliği, Resmî Gazete Tarihi: 23.05.2005, Resmî Gazete Sayısı: 25823.
3. The Food and Drug Administration (FDA) of the United States (2015). From <https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetics-guidance-regulation>. Erişim tarihi: 02.11.2021.
4. Kozmetik Ürünler Yönetmelik Değişikliği Taslak Metni, 19.04.2021, T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (2021). From <https://www.titck.gov.tr/mevzuat/kozmetik-urunler-yonetmelik-degisikligi-taslak-metni-22032021170036>. Erişim tarihi: 02.11.2021.
5. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Kozmetik Ürünlerde Güvenlilik Değerlendirmesine İlişkin Kılavuz Sürüm 3.0 (2020). From https://titck.gov.tr/storage/Archive/2020/contentFile/asd_977f480b-4a07-4e0e-bb0e-14db1fcf47d6.pdf. Erişim tarihi: 02.11.2021.
6. Kılıç E., Yılmaz F. (2018). Kozmetik ürünlerde koruyucu madde kullanımı ve koruyucu etkinlik testleri, *Türk Farmakope Dergisi*, 3(3), 89-113. [CrossRef]
7. Birteksöz Tan, A.S., Tüysüz, M. (2013). Kozmetik ürünlerde koruyucu madde kullanımı ve koruyucu etkinlik testleri, *ANKEM Dergisi*, 27(2), 83-91. [CrossRef]
8. Kıvanç, M. (2012). Kozmetik Ürünlerde Mikrobiyal Kontaminasyon, 2. Kozmetik Kongresi, Antalya. [CrossRef]
9. Bashir, A., Lambert, P. (2019). Microbiological study of used cosmetic products: highlighting possible impact on consumer health, *Journal of Applied Microbiology*, 128(2), 598-605. [CrossRef]
10. Halla, N., Fernandes, I. P., Heleno, S. A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Rodrigues, A. E., Ferreira, I., Barreiro, M. F. (2018). Cosmetics preservation: A review on present strategies. *Molecules*, 23(7), 1571. [CrossRef]
11. Kozmetik Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik-Kozmetik Ürünlerde Kullanılmasına İzin Verilen Koruyucuların Listesi (EK V), Resmî Gazete Tarihi: 15.07.2015, Sayı: 29417 (2. Mükerrer). From <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2015/07/20150715M2-2-1.pdf>. Erişim tarihi: 02.11.2021.
12. Alvarez-Rivera, G., Llompart, M., Loes, M., Garcia-Jares, C. (2018). Preservatives in cosmetics: Regulatory aspects and analytical methods. Analysis of cosmetic products: Second edition, p. 175-224. doi:10.1016/B978-0-444-63508-2.00009-6. [CrossRef]
13. TS EN ISO 29621: Kozmetikler-Mikrobiyoloji- Risk Değerlendirilmesi ve Düşük Risk Gruplarının Mikrobiyolojik Yönden Tanımlanması (2017).

14. Cengiz, G., Algın Yapar E. (2018). Neutralizants for antimicrobial effective preservatives in microbiological analysis in cosmetic products. *Current Perspectives on Medicinal&Aromatic Plants*, 2, 117-119. [\[CrossRef\]](#)
15. European Pharmacopoeia 9.0, 2.6.12. Microbiological examination of non-sterile products: microbial enumeration tests, 2017.
16. Baird, RM. (1998). Contamination of non-steril pharmaceuticals in hospital and community environments. In: Hugo WB, Russell AD (Eds). *Pharmaceutical Microbiology*, (pp. 374-384). Blackwell Science, Oxford.
17. Giacomel, C., Dartora, G., Diefethaeler, H., Haas, S. (2013). Investigation on the use of expired make-up and microbiological contamination of mascaras. *International Journal of Cosmetic Science*, 35, 375–380. [\[CrossRef\]](#)
18. Eldesoukey, R.M.M., Alqhtani, B.S., Alqhtani, A.S., Alqhtani, A.H., Alqhtani, A.M. (2016). Comparative microbiological study between traditional and modern cosmetics in Saudi Arabia. *Enzyme Engineering*, 5:2. [\[CrossRef\]](#)
19. Techaoei S. (2017). Bacterial and fungal contamination of personal care product in Northern Thailand. *Research Journal Rajamangala University of Thecnology Thanyaburi*, 16, 32-38. [\[CrossRef\]](#)
20. Babalola, M., Eze, M. (2018). Microbiological quality and characterization of potential pathogens associated with selected brands of commercial cosmetic products in Nigeria. *Microbiology Research Journal International*, 9, 1-17. [\[CrossRef\]](#)
21. Michalek, I.M., John, S.M., Caetano dos Santos, F.L. (2019). Microbiological contamination of cosmetic products-observations from Europe, 2005-2018. *Journal of European Academy of Dermatology and Venereology*, 33, 2151-2157. [\[CrossRef\]](#)
22. Akgül, Ö., Bakan, K. (2021). The aerobic bacteria isolated from used cosmetic products and evaluation of antibiotic resistance. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 45(2), 156-168. [\[CrossRef\]](#)
23. Yavaşal Çarıkcı, A.İ., Uçar, F., Yalçın, H.T. (2008). Kozmetik ürünlerde bakteriyel ve fungal kompozisyonun klasik yöntemler ve PCR yöntemi kullanılarak saptanması. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 6(1), 1-16. [\[CrossRef\]](#)
24. Ibegbulam-Njoku, P.N., Chijioke-Osuji, C.C. (2016). Microbiological evaluation of cosmetics products sourced in Aba city, Nigeria. *International Journal of Scientific Reports*, 2(4), 74-80. [\[CrossRef\]](#)
25. Feroz, F., Das, K.K. (2019). Presence of microorganisms in commonly used baby cosmetics available in Dhaka City. *Stamford Journal of Microbiology*, 9(1), 9-11. [\[CrossRef\]](#)
26. Aslam, S., Rahman, S.U., Sabir, Z., Maqbool, B. (2017). Evaluation of cosmetics for their potential contaminants and drug resistant microorganisms. *Acta Scientifica Malaysia*, 1(2), 16-19. [\[CrossRef\]](#)
27. Geis, P.A. (2006). Preservation Strategies In: *Cosmetic Microbiology*. 2nd ed. Geis PA (Eds). (p.163-180). New York: Taylor&Francis Group.

28. Skowron, K., Jakubicz, A., Budzyńska, A., Kaczmarek, A., Grudlewska, K., Reśliński, A., Gospodarek-Komkowska, E. (2017). Microbiological purity assessment of cosmetics used by one and several persons and cosmetics after their expiry date, National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 68(2), 191-197. [CrossRef]
29. Lundov, M., Moesby, L., Zachariae, C., Johansen, J. (2009). Contamination versus preservation of cosmetics: A review on legislation, usage, infections, and contact allergy. *Contact Dermatitis*, 60, 70–78. [CrossRef]
30. Birteksöz-Tan, A.S., Tüysüz, M., Ötük, G. (2013). Investigation of preservative efficacy and microbiological content of some cosmetics found on the market. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26, 153–157. [CrossRef]
31. Scientific Committee on Consumer Products (2016). The SCCP's Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and Their Safety Evaluation. From https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_190.pdf Erişim tarihi: 02.11.2021.
32. Neza, E., Centini, M. (2016). Microbiologically contaminated and over-preserved cosmetic products according rapex 2008–2014. *Cosmetics*, 3, 3. [CrossRef]
33. Centers for Disease Control and Prevention (2019). “Antibiotic Resistance Threats in the United States 2019”. From <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>. Erişim tarihi: 02.12.2020.
34. Reid, F.R., Wood, T.O. (1979). Pseudomonas corneal ulcer. The causative role of contaminated eye cosmetics. *Archives of Ophthalmology*, 97(9), 1640-1641. [CrossRef]
35. Wilson, S.E., Bannan, R.A., McDonald, M.B., Kaufman, H.E. (1990). Corneal trauma and infection caused by manipulation of the eyelashes after application of mascara. *Cornea*, 9(2), 181-182. [CrossRef]
36. Tong, S.Y., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T. L., Fowler Jr, V.G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603–661. [CrossRef]
37. Eryılmaz, M., Gürpınar, S.S. (2017). Hastanelerde sık kullanılan bazı antiseptiklerin biyofilm oluşturan ve oluşturmeyen *Staphylococcus epidermidis* suşlarına karşı antibakteriyel etkinliğinin araştırılması. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 41(1), 1-8. [CrossRef]
38. Pèriamè, M., Pagès, J.M., Davin-Regli, A. (2014). *Enterobacter gergoviae* adaptation to preservatives commonly used in cosmetic industry. *International Journal of Cosmetic Science*, 36, 386–395. [CrossRef]
39. CDC (2014). *Escherichia coli*. From <https://www.cdc.gov/ecoli/index.html>. Erişim tarihi: 22.11.2021.
40. CDC (2010). *Klebsiella pneumoniae* in Healthcare Settings. From <https://www.cdc.gov/hai/organisms/klebsiella/klebsiella.html>. Erişim Tarihi: 22.11.2021.

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. Deneylede, 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 yayımlanmak 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. Yayımlarda 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 tanıttıcı 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 verilerek 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. Etik kurul onayına gerek olmayan çalışmalarda aşağıdaki cümle yazılmalıdır.

“Yazarlar bu çalışma için etik kurul onayının zorunlu olmadığını beyan etmektedir.”

- **KAYNAKLAR:** Kaynak yazım stili Amerikan Psikoloji Derneği’ne (APA) göredir. 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 örneklerle 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. In studies that do not require ethics committee approval, the following sentence should be written.

"The authors declare that the ethics committee approval is not required for this study".

- **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 *Xylopi*a *aethi*o*pica* 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/> 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

- Bayram NALLI, Şükran KÖSE, Ömer DEMİR, Elvan GÖKMEN, Esra ÖZDAĞ, Aliye MANDIRACIOĞLU - **ECZACILARDA COVID-19 VE TEDAVİSİNE YÖNELİK BİLGİ DÜZEYİ ÖLÇÜLMESİ** - MEASURING THE KNOWLEDGE LEVEL OF COVID-19 AND ITS TREATMENT IN PHARMACISTS 1
- Mehmet Evren OKUR, Ayşe Esra KARADAĞ, Rengin REİS, Hande SİPAHİ, Rana ARSLAN, Betül DEMİRCİ, Fatih DEMİRCİ - **PHYTOCHEMICAL AND IN VITRO PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF PHLOMIS PUNGENS** - PHLOMIS PUNGENS'İN FİTOKİMYA VE İN VİTRO FARMAKOLOJİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ 11
- Dilan KONYAR, Hayati OKUR, Zehra ARSLAN - **MOLECULAR DOCKING STUDIES OF COX INHIBITORS ON WILD-TYPE RAS** - COX İNHİBİTÖRLERİNİN YABANI-TİP RAS ENZİMİ ÜZERİNDE MOLEKÜLER DOKİNG ÇALIŞMALARI 23
- Suzan ÖKTEN, Alparslan Semih SALAN, Gülcan KUYUCUKLU, Fatma KAYNAK ONURDAĞ - **ACINETOBACTER SPP. İZOLATLARINDA DIŞA ATIM POMPASI (DAP) İNHİBİTÖRLERİNİN MEROPENEMİN ETKİNLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ** - EFFECT OF EFFLUX PUMP (DAP) INHIBITORS TO EFFICACY OF MEROPENEM ON ACINETOBACTER SPP. CLINICAL ISOLATES 35
- Hande YÜCE, Neşe Başak TÜRKMEN, Dilan Aşkın ÖZEK, Songül ÜNÜVAR - **TAURİN, KAPSAİSİN, MELATONİN VE BETA KAROTENİN L929 SAĞLIKLI HÜCRELER VE MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİPROLİFERATİF, ANTİMİGRASYON VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI** - THE INVESTIGATION OF THE ANTIPROLIFERATIVE, ANTIMIGRATION AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF TAURINE, CAPSAICIN, MELATONIN AND BETA CAROTEN ON L929 HEALTHY CELLS AND MCF-7 BREAST CANCER CELLS 48
- Sarah GADO, Zeynep ATES ALAGOZ - **RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE (RDRP) INHIBITOR DRUGS AGAINST SARS-COV-2: A MOLECULAR DOCKING STUDY** - SARS-COV-2'YE KARŞI RNA-BAĞIMLI RNA POLİMERAZ (RDRP) İNHİBİTÖR İLAÇLARI: BİR MOLEKÜLER DOCKİNG ÇALIŞMASI 62
- Aslı KOÇ, Ekin KURTUL, Arzu Zeynep KARABAY, Mehmet TEKİN, Özlem BAHADIR ACIKARA - **CYTOTOXIC AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF ALCHEMILLA MOLLIS (BUSER) ROTHM. AND ITS CONTITUENTS; HYPEROSIDE AND**

- ISOQUERCETIN - *ALCHEMILLA MOLLIS* (BUSER) ROTHM. İLE BİLEŞENLERİ HİPEROZİT VE İZOKERSETİNİN SİTOTOKSİK VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİ** 78
- Muni Sireesha SUNKARA, Dharani ANNEPALLY, Donna Kanthi BITLA, Sushma BOPPY, Pallavi CHIDURALA, Jhansi CHILUKA, Saritha Jyostna TANGEDA - **TARGETTING THE 3BGQ - P1M1 K1NASE INTERACTION WITH A SERIES OF NOVEL DITHIOCARBAMATE SUBSTITUTED 2-OXOINDOLE DERIVATIVES - *IN SILICO* STUDIES** - 3BGQ - P1M1 K1NAZ ETKİLEŞİMİNİ HEDEF ALAN YENİ DİTİYOKARBAMAT İLE SÜBSTİTÜE 2-OKSOİNDOL TÜREVLERİNİN *İN SİLİKO* ÇALIŞMALARI 86
- Şükran ÖZTÜRK, Sulhiye YILDIZ - **DETERMINATION OF *UREAPLASMA UREALYTICUM* AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY IN SEXUALLY ACTIVE WOMEN WITH DIFFERENT METHODS** - CİNSEL YÖNDEN AKTİF KADINLARDA *UREAPLASMA UREALYTICUM* VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIĞININ FARKLI YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ 103
- Murat ZOR, Sultan PEKACAR, Didem DELİORMAN ORHAN - ***NASTURTIUM OFFICINALE*'NİN FİTOKİMYASAL İÇERİĞİ, ANTİOKSİDAN VE ENZİM İNHİBİTÖR ETKİLERİ** - PHYTOCHEMICAL CONTENT, ANTIOXIDANT AND ENZYME INHIBITORY EFFECTS OF *NASTURTIUM OFFICINALE* 114
- Çiğdem YAVAŞ, Fatma KAYNAK-ONURDAĞ, Suzan ÖKTEN - **ARE THE DISINFECTANTS USED IN HOSPITALS ALSO EFFECTIVE ON BACTERIA THAT CAUSE NOSOCOMIAL INFECTIONS?: A UNIVERSITY HOSPITAL INVESTIGATION** - HASTANEDE KULLANILAN DEZENFEKTANLAR NOZOKOMİYAL ENFEKSİYON ETKENİ BAKTERİLER ÜZERİNE DE ETKİLİ Mİ?: BİR ÜNİVERSİTE HASTANESİ GÖZLEMİ 129
- Muni Sireesha SUNKARA, Vinutha KUCHANA, Neelima KUDUMULA - **MOLECULAR DOCKING STRATEGY FOR MULTI-TARGET INHIBITOR DISCOVERY OF SELECTED PLANT CONSTITUENTS IN *BAUHINIA ACUMINATA*** - *BAUHINIA ACUMINATA*'DAKİ SEÇİLMİŞ FİTO BİLEŞENLERİN ÇOK HEDEFLİ İNHİBİTÖR KEŞFİ İÇİN MOLEKÜLER YERLEŞTİRME STRATEJİSİ 144
- Merve Eylül KIYMACI, Kenan Can TOK, Muhammed Mesud HÜRKUL - **A STUDY ON PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *QUERCUS MACRANTHERA* SUBSP. *SYSPIRENSIS* (K. KOCH) MENITSKY BRANCH AND LEAF EXTRACTS** - *QUERCUS MACRANTHERA* SUBSP. *SYSPIRENSIS* (K. KOCH) MENITSKY'İN DAL VE YAPRAK EKSTRELERİNİN FİTOKİMYASAL ANALİZİ VE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA 160
- Eldrin DLR. ARGUELLES - **TOTAL PHENOLIC CONTENT AND *IN VITRO* ANALYSIS OF ANTIOXIDANT, ANTIBACTERIAL, AND ALPHA-GLUCOSIDASE INHIBITION PROPERTIES OF *CHROOCOCCUS MINUTUS* (KÜTZING) NÄGELI (CHROOCOCCALES, CYANOBACTERIA)** - *CHROOCOCCUS MINUTUS* (KÜTZING) NÄGELI'NİN (CHROOCOCCALES, CYANOBACTERIA) ANTİOKSİDAN, ANTİBAKTERİYEL VE ALFA-GLUKOZİDAZ İNHİBİSYON ÖZELLİKLERİNİN TOPLAM FENOLİK İÇERİĞİ VE *İN VİTRO* ANALİZİ 170

Derlemeler / Reviews

Mevlüt AKDAĞ, Azime Berna ÖZÇELİK - **GENİŞ SPEKTRUMLU**

ANTİKANSER BİLEŞİKLER GELİŞTİRMEYE YÖNELİK POTANSİYEL BİR HEDEF: HEKSOKİNAZ-II - A POTENTIAL TARGET FOR DEVELOPING BROAD SPECTRUM ANTICANCERS: HEXOKINASE-II	182
Gülnur ARSLAN, Tijen ÖNKOL, Azime Berna ÖZÇELİK - SİKLİN BAĞIMLI KİNAZ 4/6 VE İNHİBİTÖRLERİ - CYCLIN DEPENDENT KINASE 4/6 AND INHIBITORS	193
Dorukhan HIŞIR, Meliha EKİNCİ, Derya İLEM-ÖZDEMİR - HEDEFE YÖNELİK TEDAVİDE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR: LUTESYUM-177 İLE İŞARETLİ RADYOFARMASÖTİKLER - CURRENT APPROACHES TO TARGETED THERAPY: LUTETIUM-177 LABELED RADIOPHARMACEUTICALS	209
Mustafa BUĞDAYCI, Leyla YUMRUKAYA, Selen YEĞENOĞLU - SAĞLIK KURUMLARINA YAPILAN GERİ ÖDEME YÖNTEMLERİNİN SAĞLIK EKONOMİSİ PERSPEKTİFİNDEN İNCELENMESİ - THE REVIEW OF METHODS OF REIMBURSEMENT TO HEALTH INSTITUTIONS FROM THE POINT OF HEALTH ECONOMICS	231
Hatice DEMİRTAŞ, Ceyda Tuba SENDEL-TURK - YENİ NESİL LİPİT BAZLI İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER: LİPİT NANOKAPSÜLLER - NEW GENERATION LIPID-BASED DRUG DELIVERY SYSTEMS: LIPID NANOCAPSULES	239
Ayşe ARAS, Müjde ERYILMAZ - KOZMETİK ÜRÜNLERDE GÖRÜLEN MİKROBİYOLOJİK KONTAMİNASYONLAR - MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION OF COSMETIC PRODUCTS	262