

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 : 2
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: 2
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: mkaracaoğlu@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 *Ivane 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 HASÇİÇEK

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology

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

Assoc. Prof. Dr. Işıl ÖZAKÇA GÜNDÜZ

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology

e-posta: ozakca@ankara.edu.tr

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 BEŞİKÇİ *Ankara University, Ankara, TURKEY*
Prof. Dr. Athina GERONIKAKI *Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, GREECE*
Prof. Dr. Ayşegül 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. Şükran KÜLTÜR *İstanbul University, İstanbul, TURKEY*
Prof. Dr. Tülay ÇOBAN *Ankara University, Ankara, TURKEY*
Prof. Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU *Hacettepe University, Ankara, TURKEY*

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

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 The manuscript submitted to the journal should not be published previously as a whole or in part and not be submitted elsewhere.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

Indexing and Abstracting

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

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

İÇİNDEKİLER / CONTENTS 46(2), 2022

Özgün Makaleler / Original Articles

Sayfa / Page

- Yasin DARI, Süleyman YUR, Gülmira ÖZEK, Ülkü Dilek UYSAL - **BIOLOGICAL ACTIVITY DETERMINATION OF BLACK AND WHITE CHIA SEED EXTRACTS OBTAINED BY DIFFERENT EXTRACTION METHODS** - SİYAH VE BEYAZ CHIA TOHUMLARININ FARKLI YÖNTEMLERLE ELDE EDİLEN EKSTRELERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTE TAYİNİ 277
- Samia HAJJAR, Ali JABER, Milad EL RIACHI, Fadi ABDEL SATER, Edmond CHEBLE - **GC-MS ANALYSIS OF ESSENTIAL OIL AND ANTICANCER ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM DISCARDED LEAVES OF NICOTIANA TABACUM LINN.** - KULLANILMAYAN *NICOTIANA TABACUM* LINN. YAPRAKLARINDAN ELDE EDİLEN UÇUCU YAĞIN GC-MS ANALİZİ VE EKSTRENİN ANTİKANSER AKTİVİTESİ 291
- Andrey GOTSULYA, Yevhen ZAIKA, Tetiana BRYTANOVA - **SYNTHESIS, PROPERTIES AND BIOLOGICAL POTENTIAL SOME CONDENSED DERIVATIVES 1,2,4-TRIAZOLE** - BAZI 1,2,4-TRİAZOL YOĞUNLAŞTIRILMIŞ TÜREVLERİNİN SENTEZİ, ÖZELLİKLERİ VE BİYOLOJİK POTANSİYELİ 308
- Merve Eylül KIYMACI - **INTERACTION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS WITH SOLID LIPID NANOPARTICLES** - *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*'UN KATI LİPİD NANOPARTİKÜLLER İLE ETKİLEŞİMİ 322
- Andrii SAFONOV, Denys DEMIANENKO, Yevheniia VASHCHYK, Yuliia LARIANOVSKA, Dmytro LYTKIN, Roman SHCHERBYNA, Anna OCHERETNIUK, Svitlana ROMANOVA - **HISTOLOGICAL STUDY OF A CORRECTIVE INFLUENCE OF SODIUM 2-((4-AMINO-5-(THIOPHEN-2-YLMETHYL)-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-YL) THIO) ACETATE ON THE STATE OF RATS LIVER UNDER CONDITIONS OF ACUTE IMMOBILIZATION STRESS** - AKUT HAREKETSİZLİK STRES KOŞULLARINDA SODYUM 2-((4-AMİNO-5-(TİYOFEN-2-İLMETİL)-4H-1,2,4-TRİAZOL-3-İL) TİYO) ASETAT'IN SIÇAN KARACİĞERİNİN DURUMU ÜZERİNDEKİ DÜZELTİCİ ETKİSİNİN HİSTOLOJİK ÇALIŞMASI 330
- Mert İLHAN, Muhammed Mesud HÜRKUL - **LEAF ANATOMY OF INULA PEACOCKIANA (AITCH. & HEMSL.) KOROVIN** - *INULA PEACOCKIANA* (AITCH. & HEMSL.) KOROVIN'İN YAPRAK ANATOMİSİ 342
- Gizem Rüya TOPAL, Merve Eylül KIYMACI, Yalçın ÖZKAN - **PREPARATION AND IN VITRO CHARACTERIZATION OF VANCOMYCIN LOADED PLGA NANOPARTICLES FOR THE TREATMENT OF ENTEROCOCCUS FAECALIS INFECTIONS** - ENTEROKOK ENFEKSİYONLARINDA KULLANILMAK ÜZERE VANCOMİSİN İÇEREN PLGA NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU 350
- Nilay AKSOY, Nur OZTURK, Serel ULUSOY, Rashida Muhammad UMAR, Sena ÖZAYDIN - **EVALUATION OF EDUCATIONAL NEEDS OF DIABETIC PATIENTS** - DİYABETİK HASTALARIN EĞİTİM İHTİYAÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ 364
- İsmail ÇELİK, Meryem EROL, Ebru UZUNHİSARCIKLI, Ufuk İNCE - **VIRTUAL SCREENING AND MOLECULAR DOCKING ANALYSIS ON THREE SARS-COV-2 DRUG TARGETS BY MULTIPLE COMPUTATIONAL APPROACH** - ÇOKLU HESAPLAMALI YAKLAŞIMLA ÜÇ SARS-COV-2 İLAÇ HEDEFLERİ ÜZERİNDE SANAL TARAMA VE MOLEKÜLER DOKİNG ANALİZİ 376

Hande YÜCE, Neşe Başak TÜRKMEN, Selinay ŞENKAL, Dilan Aşkın ÖZEK, Ezgi BULUT, Ayşegül DOĞAN, Songül ÜNÜVAR - PATULİNİN KARACİĞER VE AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ İN VİTRO ANTİTÜMÖR AKTİVİTESİ - IN VITRO ANTITUMOR ACTIVITY OF PATULIN ON LİVER AND LUNG CANCER CELL LINES	393
Hayrettin SEÇİLMİŞ, Ebru ÇUBUK DEMİRALAY, Kader POTURCU - DETERMINATION OF CHROMATOGRAPHIC PROTONATION CONSTANTS OF SOME IMIDAZOLE ANTIMYCOTIC DRUGS IN ACETONITRILE-WATER BINARY MIXTURES - ASETONİTRİL-SU İKİLİ KARIŞIMLARINDA BAZI İMİDAZOL ANTİMİKOTİK İLAÇLARIN KROMATOĞRAFİK PROTONASYON SABİTLERİNİN BELİRLENMESİ	405
Ece MISER-SALİHOĞLU, Bolkan SIMSEK, Erdoğan ÇAYIR, Sevgi AKAYDIN - COMPARISON OF THE PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN PEPPERMINT PLANT ACCORDING TO THE DRYING METHOD - KURUTMA YÖNTEMİNE GÖRE NANE BİTKİSİNİN FENOLİK İÇERİĞİNİN VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN KARŞILAŞTIRILMASI	418
Merve İNCİ ÇAMÇI, Meral ERDİNÇ, Emre UYAR, İlker KELLE - DENEYSEL DİYABETİN NEDEN OLDUĞU DEPRESYON TEDAVİSİNDE MİNOSİKLİN VE MİNOSİKLİN+METFORMİN KULLANIMI - EFFECT OF MINOCYCLINE AND MINOSCYCLINE+METFORMIN ON EXPERIMENTAL DIABETES-RELATED DEPRESSION	432
Kenan Can TOK, Şeyda YAYLA - GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY (GC-MS) ANALYSIS OF CONSOLIDA THIRKEANA EXTRACT - CONSOLIDA THIRKEANA EKSTRESİNİN GAZ KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE SPEKTROMETRESİ (GC-MS) ANALİZİ	444
Merve Eylül KIYMACI, Duygu SIMSEK, Nurten ALTANLAR - MOLECULAR IDENTIFICATION AND LIPOLYTIC ACTIVITY OF YARROWIA LIPOLYTICA ISOLATED FROM YOGHURT CREAM - YOĞURT KAYMAĞINDAN İZOLE EDİLEN YARROWIA LIPOLYTICA'NIN MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU VE LİPOLİTİK AKTİVİTESİ	450
Gözde YALCIN OZKAT, Birsen HUYLU - DEVELOPMENT OF NEW CYCLOPHILIN D RECEPTOR INHIBITORS FOR THE TREATMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS - MS HASTALIĞININ TEDAVİSİ İÇİN YENİ SİKLOFİLİN D RESEPTÖR İNHİBİTÖRLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ	458
Fuat KARAKUŞ, Burak KUZU - POSSIBLE CARDIOPROTECTIVE MECHANISM OF ACTION OF DEXRAZOXANE, AND PROBABLE HUMAN TOPOISOMERASE IIβ INHIBITORS: AN IN SILICO ANALYSIS - DEKSRAZOKSANIN OLASI KARDİYOPROTEKTİF ETKİ MEKANİZMASI VE MUHTEMEL İNSAN TOPOİZOMERAZ IIB İNHİBİTÖRLERİ: İN SİLİCO ANALİZ	474
Derlemeler / Reviews	
Burçin MERSİN, Gülçin SALTAN İŞCAN - MORINGA OLEIFERA'NIN ETKİNLİK VE GÜVENLİĞİ - SAFETY AND EFFICACY OF MORINGA OLEIFERA	487
Tuğçe İNCE KÖSE, Ayşe Mine GENÇLER ÖZKAN - ANTİVİRAL ETKİLİ BİTKİLER - ANTIVIRAL HERBS	505
Ahmet Hüsamettin BARAN - ANTİPARKİNSON İLAÇLARINA VERİLEN BİREYSEL YANITTA FARMAKOGENETİĞİN ROLÜ - THE ROLE OF PHARMACOGENETICS IN INDIVIDUAL RESPONSE TO ANTIPARKINSONIAN DRUGS	523
Songül TEZCAN - MANAGEMENT OF DRUG INTERACTIONS IN COLON CANCER PATIENTS	537

- KOLON KANSERİ HASTALARINDA İLAÇ ETKİLEŞİMLERİNİN YÖNETİMİ

- Ezgi AYDIN, Ali AYDIN, Gizem ÇETİNER, Gülşah EREL-AKBABA - **DOĞADAN İLHAM ALAN BİYOMİMETİK NANOTAŞIYICI SİSTEMLER** - NATURE-INSPIRED BIOMIMETIC NANOCARRIER SYSTEMS **551**
- Sultan PEKACAR, Didem DELİORMAN ORHAN - ***PISTACIA LENTISCUS* L. TÜRÜNÜN BOTANİK, ETNOFARMAKOLOJİK, FİTOKİMYASAL VE FARMAKOLOJİK AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ** - EVALUATION OF BOTANICAL, ETHNOPHARMACOLOGICAL, PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF *PISTACIA LENTISCUS* L. SPECIES **576**
- Jale AKGÖL, Ayşegül KÖROĞLU - **UYUZ HASTALIĞI (SKABİYES), TEDAVİSİ VE UYUZ HASTALIĞI TEDAVİSİNDE KULLANILAN BİTKİLER** - SCABIES, SCABIES TREATMENT AND PLANTS USED IN THE TREATMENT OF SCABIES **600**
- Gözde YENİCE ÇAKMAK, Ahmet Özer ŞEHİRLİ - **TREATMENT OF BEHÇET'S DISEASE AND CURRENT APPROACHES** - BEHÇET HASTALIĞININ TEDAVİSİ VE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR **619**
- Nilgün ÜNAL - **COVID-19 YAYILMASINDA ARKADAŞ HAYVANLARIN ROLÜ** - THE ROLE OF COMPANION ANIMALS IN SPREADING COVID-19 **651**



BIOLOGICAL ACTIVITY DETERMINATION OF BLACK AND WHITE CHIA SEED EXTRACTS OBTAINED BY DIFFERENT EXTRACTION METHODS

SİYAH VE BEYAZ CHIA TOHUMLARININ FARKLI YÖNTEMLERLE ELDE EDİLEN EKSTRELERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTE TAYİNİ

Yasin DARI¹ , Süleyman YUR^{2,3} , Gülmira ÖZEK² , Ülkü Dilek UYSAL^{4*} ,
Temel ÖZEK² 

¹Anadolu University, Institute of Health Sciences, Department of Analytical Chemistry, 26470, Eskişehir, Turkey

²Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 26470, Eskişehir, Turkey

³Anadolu University, Medical Plant, Drug and Scientific Research and Application Center (AUBIBAM), 26470, Eskişehir, Turkey

⁴Eskişehir Technical University, Faculty of Science, Department of Chemistry, 26470, Eskişehir, Turkey

ABSTRACT

Objective: *Determination and comparison of the biological activities of black and white chia seeds in extracts obtained by different extraction techniques.*

Material and Method: *Biological activity studies of extracts obtained by different techniques were determined by applying DPPH radical scavenging potential test, TEAC test and ORAC test. In addition, total phenol and flavonoid amounts were determined in methanolic extract samples.*

Result and Discussion: *In this study, phenol amount was determined as 9.86 mg GAE/g for black seed and 12.69 mg GAE/g for white seed and the total amount of flavonoids was determined as 0.098 mg RE/mL for black chia seed and 0.099 RE/mL for white seed. In addition, considering the antioxidant activity tests, the highest antioxidant activity for TEAC test was found in both black and white seed extracts obtained by the Cold press method, the highest activity for DPPH was in the white seed extracted obtained by the Cold press method, and the highest activity for ORAC test was observed in the white seed extract obtained by the Folch technique.*

Keywords: *Biological activity, chia, DPPH, ORAC, TEAC*

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Ülkü Dilek Uysal
e-mail / e-posta: duysal@eskisehir.edu.tr, **Phone / Tel.:** +903350580/4823

ÖZ

Amaç: Siyah ve beyaz chia tohumlarının biyolojik aktivitelerinin farklı ekstraksiyon teknikleriyle elde edilen ekstraktlerde tayinlerinin yapılması ve karşılaştırılması.

Gereç ve Yöntem: Farklı tekniklerle elde edilen ekstraktlerin biyolojik aktivite çalışmaları, DPPH radikal süpürme potansiyeli testi, TEAC testi ve ORAC testi uygulanarak tayin edilmiştir. Ayrıca metanollü ekstre numunelerinde toplam fenol ve flavonoid miktar tayinleri yapılmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Bu çalışmada fenol miktarı siyah chia tohumu için 9,86 mg GAE/g, beyaz chia tohumu için ise 12,69 mg GAE/g olarak belirlenmiş olup, toplam flavonoid miktarı ise siyah chia tohumu için 0,098 mg RE/mL ve beyaz chia tohumu için 0,099 mg RE/mL olarak belirlenmiştir. Ayrıca yapılan antioksidan aktivite testleri göz önüne alındığında, TEAC testi için en yüksek antioksidan aktivite, soğuk sıkım yöntemiyle elde edilen hem siyah hem de beyaz tohum ekstresinde, DPPH için en yüksek aktivite, soğuk sıkım tekniğiyle elde edilen beyaz tohum ekstresinde, ORAC testi için en yüksek aktivite ise Folch tekniğiyle elde edilen beyaz tohum ekstresinde görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Biyolojik aktivite, chia, DPPH, ORAC, TEAC

INTRODUCTION

Salvia hispanica L. (Chia) is a species belonging to the Lamiaceae family. Chia; grows naturally in tropical and subtropical environments [1]. It has been cultivated by the Aztecs since pre-Columbian cultures. It has been used as food, either as a whole or in a ground form [2]. Generally, Central and South America are the regions where chia is naturally grown since it has this necessary climate. In addition, it can be grown in the Mediterranean and Southeast Africa [3]. Nowadays chia is considered as a *pseudo-cereal*, which is cultivated for medicinal, pharmaceutical and food usage. Researches around the world have been reporting about the chemical profiles as well as pharmacological and nutraceutical benefits of chia seeds [4].

In literature there are a number of papers dedicated to investigation of many aspects with relevance to agrarian, phytochemical, pharmacological, nutraceutical and medicinal benefits of chia [5,6,7]. Previous investigation on chia seeds resulted with wide range of biological activities: hypoglycemic [8], antimicrobial and antiproliferative [9], hepatoprotective [10], antioxidant and anti-obesity [11]. There were carried out animal studies [12,13] and those that have focused on human participants [14,15] have investigated the seeds' main components by isolating and evaluating them to gain knowledge of their health and nutrition benefits. Research indicates that components of chia seeds are ascribed a beneficial effect on the improvement of the blood lipid profile, through their hypotensive, hypoglycaemic, antimicrobial and immunostimulatory effects. Various chia seeds differed in superoxy dismutase (SOD) activity and exhibited high antiradical activity against 2,2-azino-bis (3-ethylbenzylthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) [16]. The results show that chia seeds are suitable for use as an antioxidant ingredient in gluten-free diets and health foods of celiac patients [17].

The main results of phytochemical investigations dedicated to chia seeds have concerned with fatty acids composition and phenolic compounds. Kulczynski (2019) has recently gave comprehensive

evaluation on the current state of knowledge about the chemical composition and nutritional value of chia seeds [18]. The fatty acid profile is characterized by abundance of polyunsaturated fatty acids, mainly α -linolenic acid. Linoleic, oleic and palmitic acids are found in lower amounts. Chia seeds have greater contents of omega-3 acids than flaxseed. Chia seeds contain phenolic compounds such as chlorogenic acid, caffeic acid, gallic, cinnamic and ferulic, *p*-coumaric acids, quercetin, rutin, kaempferol, epicatechin, myricetin and apigenin. Isoflavones, such as daidzein, glycitein, genistein and genistin, are found in small amounts [19,20].

Phenolic compounds are widely found in both edible and non-edible plants and have many biological effects, including antioxidant activity. Raw extracts of fruits, herbs, vegetables, cereals and other plant materials rich in phenolics are gaining increasing attention in the food industry, as they delay the oxidative degradation of lipids, improving the quality and nutritional value of foods [21].

In this research, a comprehensive scan was carried out, including a comparison of black and white seed unlike previous one. The chia seeds have been subjected to extraction with different extraction techniques to get lipophilic extracts. The extracts of chia seeds were subjected to antioxidants trials against different substrates and through different mechanisms. Thus, it was planned to obtain more detailed and accurate results about the antioxidant activity capacity of chia seeds. The studies on the examining of black and white chia seed extracts biological activities obtained with different extraction methods separately is very limited. The studies on the determination of total phenol and flavonoid amount of chia seeds are similar to those in his study and were carried out by optimizing different methods or using different solvents. In this respect, our study is original and will guide further research.

MATERIAL AND METHOD

Chemicals

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma Aldrich, USA, 257621), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox) (Sigma Aldrich, Germany, % 97), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (Sigma Aldrich, USA, % 98), rutin (Sigma Aldrich, Germany), quercetin (Sigma Aldrich, Germany), gallic acid (Sigma Aldrich, China), potassium persulfate (Sigma Aldrich, Germany), disodium hydrogen phosphate, sodium dihydrogen phosphate, fluorescein (Sigma Aldrich, USA, F6377), 2,2'-Azobis (2-amidinopropan) dihydrochloride (AAPH) (Sigma Aldrich, USA, %97, 440914), sodium carbonate (Merck, Germany), Folin & Ciocalteu reagent (FCR) (Sigma Aldrich, USA, F9252), aluminium chloride (Merck, Germany, 801081).

Plant Material

Black and white chia seeds were purchased commercially from a local market in July 2019 in Eskişehir. In this study, the chia seeds that originated from Argentina were used.

Obtaining Extracts

Black and white chia seeds have been subjected to five different extraction techniques to get lipophilic extracts: accelerated solvent extraction (ASE), continuous solvent extraction (Soxhlet apparatus), supercritical fluid extraction (SFE), Folch method and cold pressing.

Antioxidant Activity

Free Radical Scavenging Assay (DPPH Test)

Radical scavenging potentials of the extracts obtained by different extraction methods were tested with DPPH radical [22]. In the experiment, the extract solutions (10 mg/mL in MeOH) and standard substance of gallic acid (0.1 mg/mL in MeOH) were diluted 8 times with methanol using an 8-channel automatic pipettor (Eppendorf Xplorer) to 96-well plate (10; 5; 2.5; 1.25; 0.625; 0.31; 0.16; 0.08 mg/mL) were added. 100 μ L sample and 100 μ L DPPH (0.08 mg/mL in MeOH) were added into the well and incubated in the dark at room temperature for 30 minutes. At the end of the period, the absorbance values were measured and recorded at a wavelength 517 nm using a spectrophotometer. Methanol was used as a blank and gallic acid solution (0.1 mg/mL) was used as positive control. The results are calculated according to equation (1) over 3x3 repetitions:

$$\% \text{ Inh} = \frac{\text{Absorbance}_{\text{control}} - \text{Absorbance}_{\text{sample}}}{\text{Absorbance}_{\text{control}}} \times 100 \quad (1)$$

Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) Test

The ABTS radical scavenging effect of extracts obtained by different extraction methods was determined by TEAC test [23]. In order to obtain ABTS cation radical, an aqueous solution of $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (2.5 mM) and ABTS (7 mM) was prepared. The solution was kept in the dark for 16 hours until the reagent became active. Approximately 3 mL of the prepared stock solution was taken and diluted with absolute ethanol up to the absorbance range of 0.700-0.800 at a wavelength of 734 nm in UV spectrophotometer. The calibration curve was obtained using five different concentrations of trolox (3.0; 2.0; 1.0; 0.5; 0.1 mM in MeOH). In the experiment, 10 μ L of the sample solution (10 mg/mL in MeOH) and 990 μ L of ABTS^{++} were placed on a 96-deep well plate and incubated for 30 minutes at room temperature in the dark. Absorbance measurements were made with a spectrophotometer at 734 nm wavelength. By using the calibration curve of trolox, antioxidant capacity values equivalent to trolox were determined [24]. The experiments were performed in triplicate.

Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay (ORAC Test)

Oxygen radical scavenging effect of the extracts obtained by different extraction techniques was investigated by ORAC method. It was determined by a method based on the principle of scavenging

peroxyl radicals produced by AAPH [25]. 25 μL of sample solution (10 mg / mL) and 150 μL of 4 nM fluorocein were placed in 96-well plates and incubated for 30 minutes at 37 °C in the dark. Then, 25 μL of 225 mM AAPH solution was added. Then, the mixture was shaken for 10 seconds. Afterwards, the samples were excited at 485 nm wavelength for 180 minutes and left to the plate reader spectrophotometer to emit at 535 nm wavelength and measurements were recorded per minute. Trolox solutions prepared in five different concentrations were used in the study (50; 25; 12.5; 6.25; 0 μM). The results were calculated by calculating the area under the curve equal to the trolox.

Total Phenol Content Determination

Total phenol determination of the extracts obtained from black and white chia seeds was determined by spectrophotometric method using Folin-Ciocalteu reagent (FCR) [25]. For this purpose, 1,0; 0.8; 0.6; 0.4; 0.2 and 0.1 mg / mL of gallic acid solutions in MeOH were prepared and the calibration curve was drawn on the basis of the reaction results with FCR. In the experiment, 20 μL of sample/standard solution, 1.56 mL of distilled water and 100 μL of FCR were added into a 96-well plate. After waiting for about 8 minutes, 250 μL of Na_2CO_3 (20% (v/v) aqueous solution) was added to the wells and incubated for 2 hours at room temperature. At the end of the period, the reaction results were determined by measuring the absorbance values at 760 nm wavelength by spectrophotometer. The results were taken over 3 \times 3 repetitions and determined as equivalent to gallic acid [26, 27, 28].

Total Flavonoid Content Determination

Total flavonoid quantification of black and white chia seeds was routinely calculated using AlCl_3 reagent as equivalent to quercetin. Rutin and quercetin were prepared at concentrations of 1.0; 0.8; 0.6; 0.4; 0.2 and 0.1 mg / mL. 80 μL of AlCl_3 (2 g / 100 mL) reagent and 1.85 mL of absolute ethanol were added onto 80 μL of sample. One drop of acetic acid was used as a blank instead of AlCl_3 reagent. After incubation for 40 minutes at room temperature, the absorbance values were recorded at 415 nm. The total amount of flavonoids in the samples were determined by drawing the calibration curve of rutin and quercetin compared with the extracts. The experiments were performed in triplicate [26, 28, 29].

RESULT AND DISCUSSION

In recent years, interest to Chia seeds has tremendously grown due to their high nutritional and medicinal values that approved by number of scientific research works [30].

Antioxidant Activity Results

In order to evaluate the antioxidant potential of the extracts obtained, different antioxidant activity experiments were applied. Antioxidant activity tests are divided into two according to their mechanisms: electron transfer (ET) and hydrogen atom transfer (HAT). Total phenol and flavonoid tests, TEAC assay and DPPH tests were performed by ET mechanism method and ORAC test by HAT mechanism.

DPPH Free Radical Scavenging Results

DPPH radical scavenging effects of black and white chia seed extracts obtained by different extraction methods were calculated as percentage inhibition and are shown in Table 1.

There are few studies on the DPPH radical scavenging for chia seeds in the literature. The DPPH free radical scavenging effect of phenolic compounds in chia seeds was tested and $32.35 \mu\text{g GAE} / \text{mL}$ extract was found [31]. In another the DPPH radical scavenging work of chia, it was determined as $5.63 \pm 0.12 \text{ mg Trolox} / \text{g fresh weight}$ [32]. The reason why the results are different from ours can be the use of different extraction techniques.

Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Results

The antioxidant capacity of black and white chia seed extracts obtained by different extraction methods was determined according to the scavenging effect of ABTS radical, and the Trolox equivalent antioxidant capacity values of the samples are shown in Table 1. The calibration curve, equation and R^2 value of the standart antioxidant compound (Trolox) are shown in Figure 1.

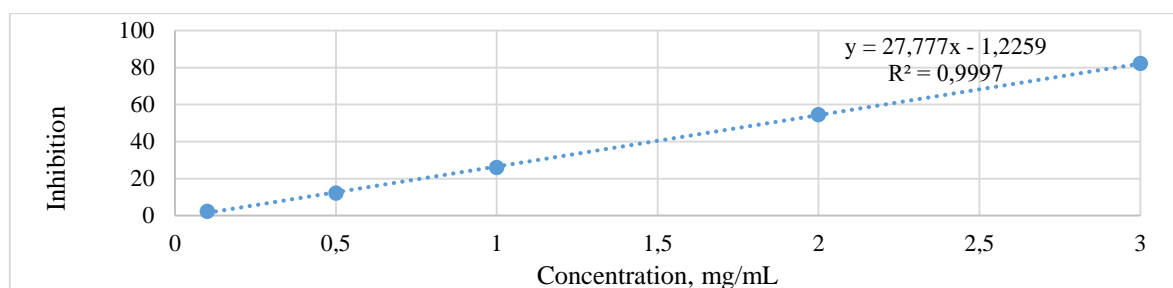


Figure 1. Calibration curve of trolox

As far as we know there is a few TEAC test study for chia seeds. In a previous study, the TEAC test results for chia were found to be 1.317 ± 0.027 and 2.174 ± 0.010 which are lower than our results (approximately between 5.15 ± 0.85 and 10.17 ± 1.14) [33]. In a similar study, the ABTS test results of chia were revealed as $4.73 \pm 0.67 \text{ mg Trolox} / \text{g fresh weight}$ [32]. These values show that the chia seeds we studied have higher antioxidant activity than the previous one.

Oxygen Radical Antioxidant Capacity Results

The oxygen radical absorbance capacity of black and white chia seed extracts obtained by different extraction methods was determined as equivalent to Trolox and the results are given in Table 1. The change of the luminescence values of the fluorescein compound versus time with the effects of chia seed extracts is shown in Figure 2 and Figure 3.

The ORAC test result for chia was found to be $6.48 \pm 0.47 \mu\text{mol TE} / \text{g}$ which is lower than our result (ranging between 0.015 ± 0.001 and $0.107 \pm 0.002 \text{ mM TE} / \text{g}$) in the literature. From these results, we can say that the antioxidant activity of the chia seeds we studied is higher than the other.

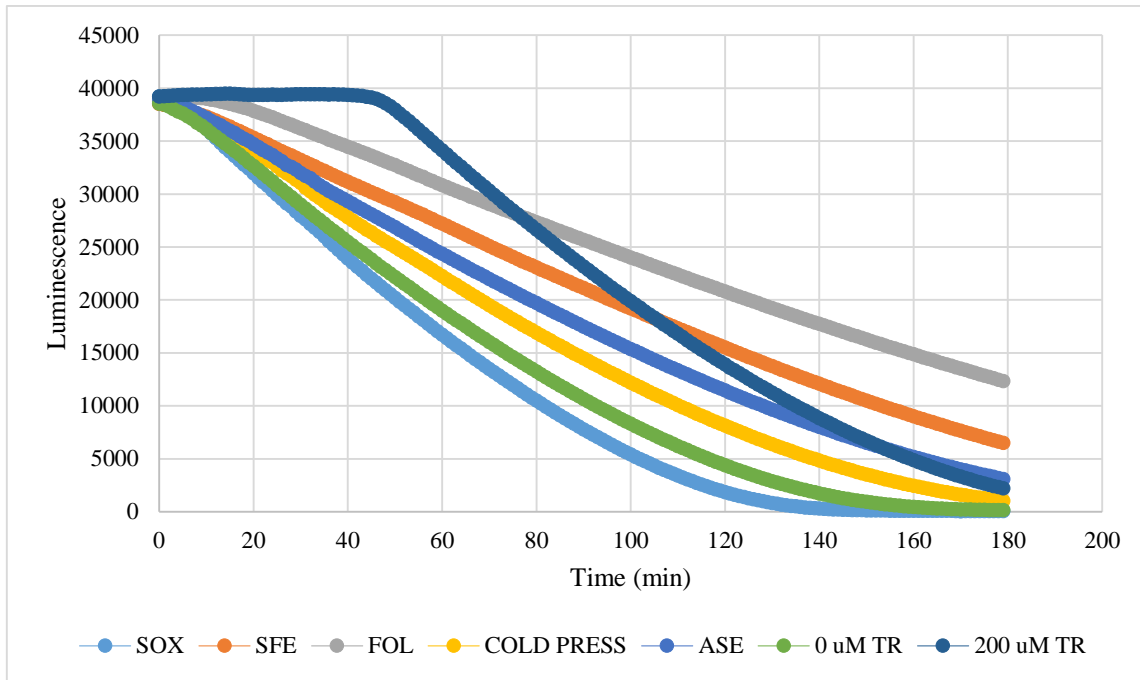


Figure 2. Change of fluorescein luminescence values over time under the influence of black chia seed extracts

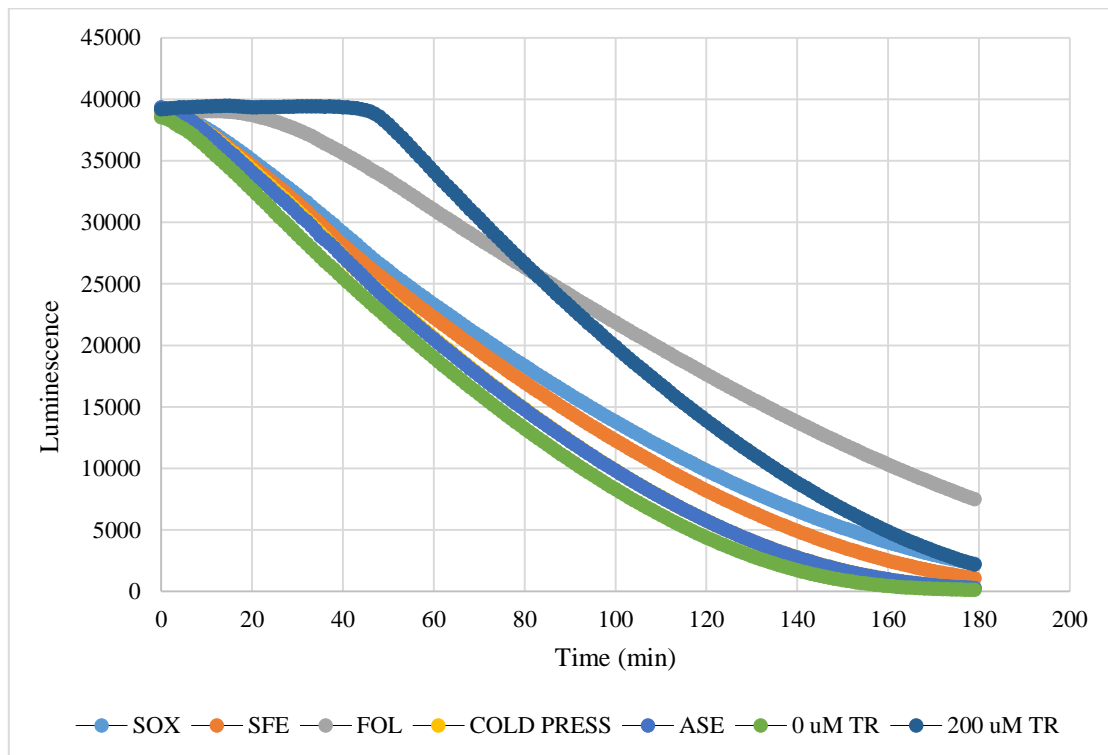


Figure 3. Change of fluorescein luminescence values over time under the influence of white chia seed extracts

Table 1. Antioxidant activities of the extracts obtained from black and white chia seeds with different extraction techniques*

		DPPH** (\pm SD)	TEAC*** (\pm SD)	ORAC*** (\pm SD)
SOXHLET	Black	9.33 \pm 1.44	7.22 \pm 1.51	0.052 \pm 3.437 E - 06
	White	8.61 \pm 2.35	7.30 \pm 2.13	0.015 \pm 9.86 E - 05
FOLCH	Black	19.65 \pm 1.95	5.98 \pm 0.85	0.056 \pm 0.001
	White	19.01 \pm 1.68	9.11 \pm 1.47	0.107 \pm 0.002
SFE	Black	8.24 \pm 0.55	7.20 \pm 0.82	0.032 \pm 0.001
	White	19.66 \pm 1.76	6.05 \pm 1.19	0.036 \pm 0.001
COLD PRESS	Black	15.70 \pm 2.59	10.17 \pm 1.14	0.049 \pm 0.004
	White	20.76 \pm 0.80	10.06 \pm 0.94	0.015 \pm 0.001
ASE	Black	15.41 \pm 0.02	7.56 \pm 0.64	0.081 \pm 0.005
	White	19.08 \pm 0.75	5.15 \pm 0.85	0.022 \pm 0.001

*The concentration of all samples is 10 mg/mL; ** Inhibition %; *** (mM TE/gE), SD: Standard Deviation

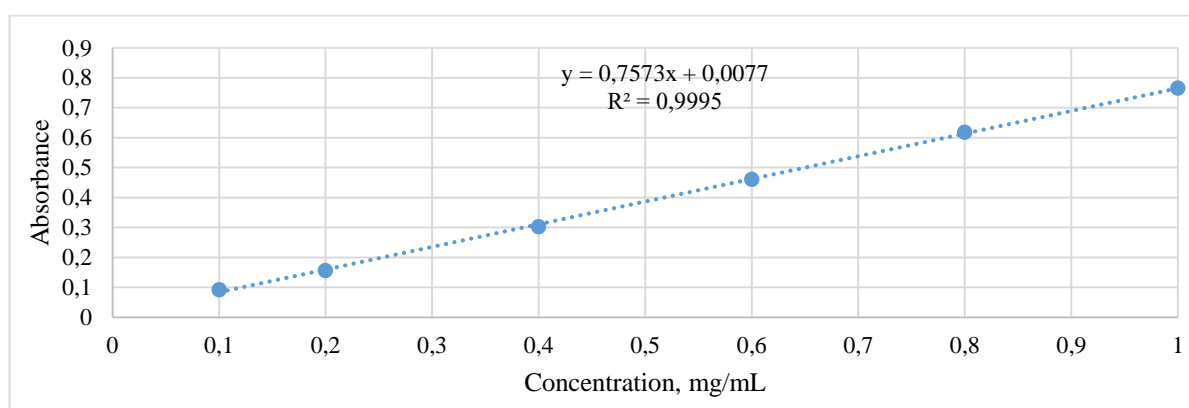
Total Phenol Contents Results

Phenol contents of methanolic extracts obtained from black and white chia seeds were determined using FCR reagent. Total phenol amounts were calculated as equivalent to gallic acid and are given in Table 2. The calibration curve of gallic acid (0-1.0 mg/mL) is shown in Figure 4.

Table 2. Total phenol and flavonoid contents of the methanolic chia seed extracts

	Black chia seed (amount \pm SD)**	White chia seed (amount \pm SD)***
Total Phenol Amounts*	9.86 \pm 0.78	12.69 \pm 1.73
Total Flavonoid amounts**	0.098 \pm 0.002	0.099 \pm 0.004

*GAE: Equivalent to Gallic Acid (mg GAE/gextract); **RE: Equivalent to Rutine (mg RE/mL); ***SD: Standard Deviation

**Figure 4.** Calibration curve of gallic acid

A previous study in the literature showed that the total phenol content of raw and roasted chia seeds was 3.07 ± 0.01 and 3.43 ± 0.07 mg GAE/g, respectively [34]. The reason for the high phenol content in our study was considered to be due to the extraction procedure performed in the shaker for 24 hours.

Total Flavonoid Contents Results

Flavonoid quantification of the methanolic extracts of black and white chia seeds was determined by AlCl_3 reagent, equivalent to rutin. The results are given in Table 2. Calibration curves, equations and R^2 values of rutin (0-1.0 mg/mL) shown in Figure 5.

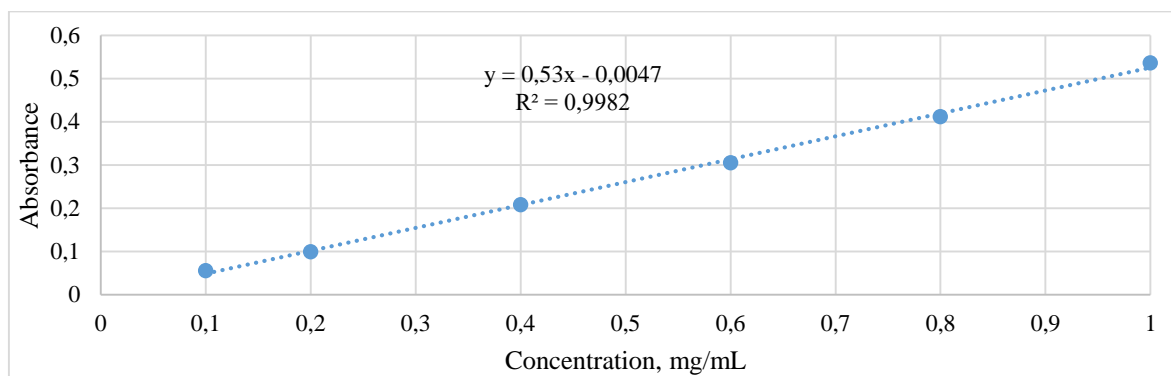


Figure 5. Calibration curve of rutin

In a similar study, the flavonoid content of chia seeds was found to be between 0.055 ± 0.014 and 0.162 ± 0.03 mg QE/g. The reason why the results differ from our study was that different solvents were used and the percentage of solvent was different and it was equivalent to quercetin instead of rutin.

When comparing DPPH radical scavenging effects of black and white chia seed extracts using different extraction techniques, it was observed that the scavenging effect of white chia seed was higher than that of black seed in general. However, the highest activity was determined in the extract obtained by Folch method for black seed. The highest activity in the white seed was determined in the extract obtained by cold pressing technique (Figure 6).

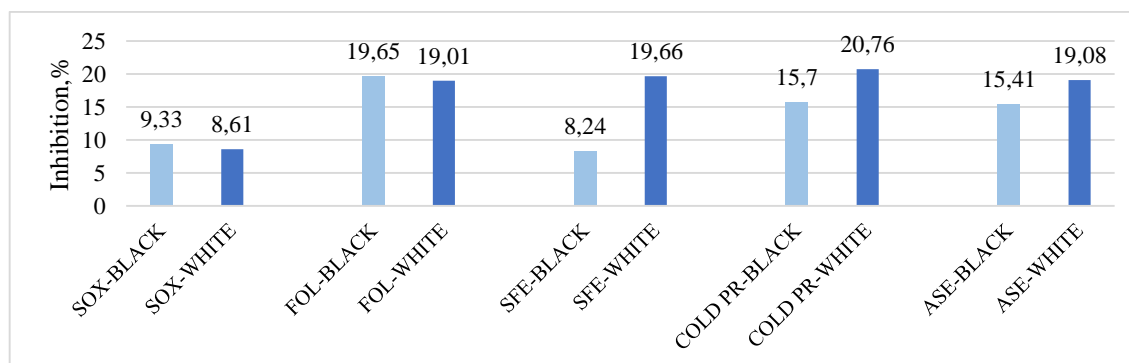


Figure 6. DPPH radical scavenging effect of black and white chia seed extracts.

Considering the scavenging effects of black and white chia seed extracts using different extraction techniques, the highest activity was found in the extracts obtained by cold pressing technique in both seeds. The lowest activity was observed in the extract obtained by the Folch method for black seed, and in the extract obtained by the ASE technique for white seed (Figure 7).

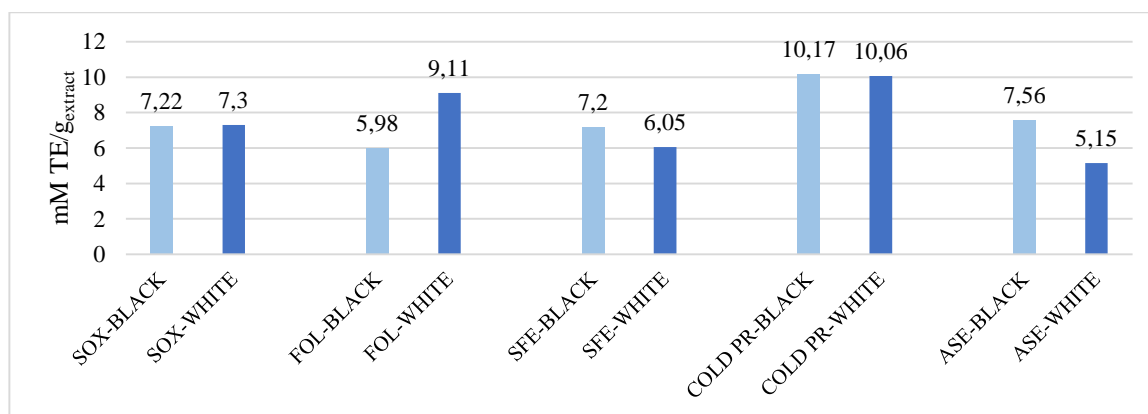


Figure 7. ABTS radical scavenging effect of black and white chia seed extracts

When the scavenging effects of AAPH radical were observed with the ORAC test of black and white chia seed extracts applied with different extraction techniques, the highest activity was detected in the extract obtained by the ASE technique for black seed, while the highest activity for white seed was found in the extract obtained by the Folch method (Figure 8).

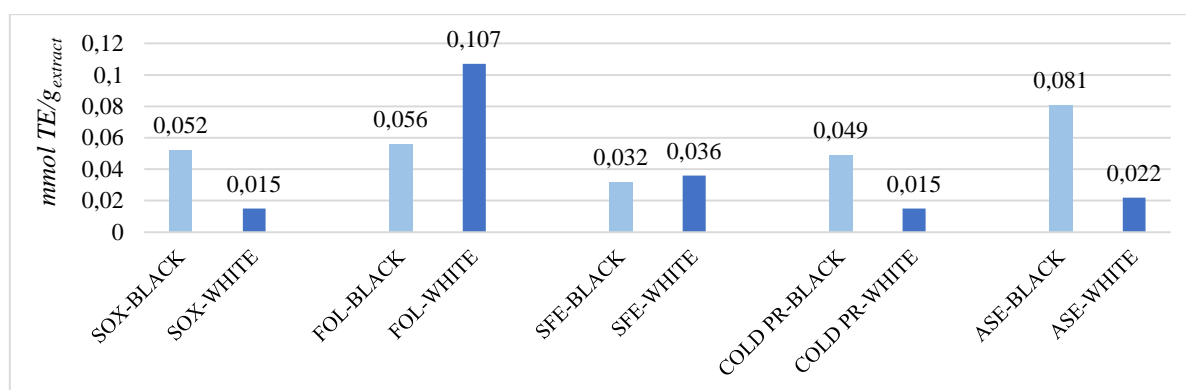


Figure 8. AAPH radical scavenging effect of black and white chia seed extracts by ORAC test

Three different antioxidant activity test results were compared, it was seen that samples obtained by cold pressing technique in DPPH and TEAC experiments had the highest inhibition values. However, in the ORAC test results, it was determined that the extract of the white seed obtained by the Folch method was the most effective. In the both DPPH and TEAC tests based on the electron transfer mechanism, the highest radical scavenging effect was observed for the chia extract obtained by cold

press technique. In the ORAC test based on the hydrogen atom transfer mechanism, the highest radical scavenging effect was observed for the chia extract obtained by Folch method.

In this study, the phenol amount was determined as 9.86 mg GAE/g for black seed and 12.69 mg GAE/g for white seed. The total amount of flavonoids was determined as 0.098 mg RE/mL for black chia seed and 0.099 mg RE/mL for white seed.

Chia is one of the most frequently used as a food for diet programs due to its rich mineral and unsaturated fatty acid content nowadays. This case increases the importance and number of researches on chia.

In conclusion, in this study, the biological activities of chia seeds were investigated using different extraction techniques. The findings, which are different from the previous studies, show that the results of this study will guide the selection of the appropriate extraction technique in the phytochemical analyzes of chia seeds in the future.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Eskişehir Technical University Scientific Research Projects (Project No: 19ADP063) for financial support and Anadolu University, Medicinal Plant, Drug and Scientific Research and Application Center (AUBIBAM) for technical support.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception: *T.Ö., G.Ö.*; Design: *T.Ö., G.Ö., Ü.D.U.*; Supervision: *T.Ö., G.Ö., Ü.D.U.*; Resources: *T.Ö., Ü.D.U.*; Materials: *T.Ö., Ü.D.U.*; Data collection and/or processing: *S.Y., Y.D.*; Analysis and/or interpretation: *S.Y., Y.D., G.Ö.*; Literature search: *S.Y., Y.D.*; Writing manuscript: *Y.D., G.Ö., Ü.D.U.*; Critical review: *Ü.D.U., G.Ö.*; 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. Bochicchio, R., Philips, T.D., Lovelli, S., Labella, R., Galgano, F., Di Marisco, A., Perniola, M., Amato, M. (2015). Innovative crop productions for healthy food: the case of chia (*Salvia hispanica* L.). *The Sustainability of Agro-Food and Natural Resource Systems in the Mediterranean Basin*, 29-45. [\[CrossRef\]](#)
2. Hernandez, L.M. (2012). PhD Thesis. Mucilage from chia seeds (*Salvia hispanica*): *Microstructure, physico-chemical characterization and applications in food industry*. Pontificia Universidad Catolica De Chile, Retrieved from <https://repositorio.uc.cl/handle/11534/1889>.
3. Delamare, A.P.L., Moschen-Pistorello, I.T., Artico, L., Atti-Serafini, L., Echeverrigaray, S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*, 100(2), 603-608. [\[CrossRef\]](#)
4. Kowaleski, J., Quast, L.B., Steffens, J., Lovato, F., dos Santos, L.R., da Silva, S.Z., de Souza, D.M., Felicetti, M.A. (2020). Functional yogurt with strawberries and chia seeds. *Food Bioscience*, 37, 100726. [\[CrossRef\]](#)
5. Wang, D.H., Wang, Z., Chen, R., Kothapalli, K., Brenna, J.T. (2020). Very Long-Chain Branched-Chain Fatty Acids in Chia Seeds: Implications for Human Use. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(47), 13871-13878. [\[CrossRef\]](#)
6. del Carmen Beltrán-Orozco, M., Martínez-Olguín, A., del Carmen Robles-Ramírez, M. (2020). Changes in the nutritional composition and antioxidant capacity of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) during germination process. *Food Science and Biotechnology*, 29(6), 751-757. [\[CrossRef\]](#)
7. Mihafu, F.D., Kiage, B.N., Okoth, J.K., Nyerere, A.K. (2020). Nutritional Composition and Qualitative Phytochemical Analysis of Chia Seeds (*Salvia hispanica* L.) Grown in East Africa. *Current Nutrition & Food Science*, 16(6), 988-995. [\[CrossRef\]](#)
8. Mihafu, F.D., Kiage, B.N., Kimang'a, A.N., Okoth, J. K. (2020). Effect of chia seeds (*Salvia hispanica*) on postprandial glycaemia, body weight and hematological parameters in rats fed a high fat and fructose diet. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 14(5), 1752-1762. [\[CrossRef\]](#)
9. Güzel, S., Ülger, M., Yusuf, Ö. (2020). Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds. *International Journal of Secondary Metabolite*, 7(3), 174-180. [\[CrossRef\]](#)
10. Apoorva, N., Rashmi, R.R., Preethi, J.S., Sindhu, H., Teerthanath, S. (2020). *Salvia hispanica* (Chia) seeds afford hepatoprotection against Isoniazid and Rifampicin induced toxicity in a murine model. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 13(10), 4805-4810. [\[CrossRef\]](#)
11. Rubavathi, S., Ayyappadasan, G., Sangeetha, N., Harini, T., Saranya, D., Harshapradha, P. (2020). Studies on Antioxidant and Anti-obesity Activity of *Salvia hispanica* (Chia) Seeds Extracts. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10(3-s), 98-106. [\[CrossRef\]](#)
12. Schreyer, S., Klein, C., Pfeffer, A., Rasińska, J., Stahn, L., Knuth, K., Abuelnor, B., Panzel, A.E.C., Rex, A., Koch, S., Hemmati-Sadeghi, S., Steiner, B. (2020). Chia seeds as a potential cognitive booster in the Alzheimer's disease model. *Scientific Reports*, 10(1), 1-16. [\[CrossRef\]](#)

13. Ayerza, R., Coates, W. (2005). Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. *Nutrition Research*, 25(11), 995-1003. [\[CrossRef\]](#)
14. de Souza Ferreira, C., de Sousa Fomes, L.D.F., Santo da Silva, G.E., Rosa, G. (2015). Effect of chia seed (*Salvia hispanica* L.) consumption on cardiovascular risk factors in humans: a systematic review. *Nutricion Hospitalaria*, 32(5), 1909-1918. [\[CrossRef\]](#)
15. Jin, F., Nieman, D.C., Sha, W., Xie, G., Qiu, Y., Jia, W. (2012). Supplementation of milled chia seeds increases plasma ALA and EPA in postmenopausal women. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(2), 105-110. [\[CrossRef\]](#)
16. da Silva Marineli, R., Lenquiste, S.A., Moraes, E.A., Maróstica Jr, M.R. (2015). Antioxidant potential of dietary chia seed and oil (*Salvia hispanica* L.) in diet-induced obese rats. *Food Research International*, 76, 666-674. [\[CrossRef\]](#)
17. Kačmárová, K., Lavová, B., Socha, P., Urminská, D. (2016). Characterization of protein fractions and antioxidant activity of Chia seeds (*Salvia Hispanica* L.). *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 10(1), 78-82. [\[CrossRef\]](#)
18. Kulczyński, B., Kobus-Cisowska, J., Taczanowski, M., Kmiecik, D., Gramza-Michałowska, A. (2019). The chemical composition and nutritional value of chia seeds-Current state of knowledge. *Nutrients*, 11(6), 1242. [\[CrossRef\]](#)
19. Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., Valdivia-López, M. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107(2), 656-663. [\[CrossRef\]](#)
20. Ayerza, R. (2013). Seed composition of two chia (*Salvia hispanica* L.) genotypes which differ in seed color. *Emirates Journal of Food & Agriculture (EJFA)*, 25(7). [\[CrossRef\]](#)
21. Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J-P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3954-3962. [\[CrossRef\]](#)
22. Sharma, O.P., Bhat, T.K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202-1205. [\[CrossRef\]](#)
23. van den Berg, R., Haenen, G.R., van den Berg, H., Bast, A. (1999). Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, 66(4), 511-517. [\[CrossRef\]](#)
24. Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I., Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7), 1496-1547. [\[CrossRef\]](#)
25. Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., Mérillon, J-M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1768-1774. [\[CrossRef\]](#)
26. Yur, S., Tekin, M., Göger, F., Başer, K.H., Özek, T., Özek, G. (2017). Composition and potential of *Tanacetum haussknechtii* Bornm. Grierson as antioxidant and inhibitor of acetylcholinesterase,

- tyrosinase, and α -amylase enzymes. *International Journal of Food Properties*, 20(sup3), S2359-S2378. [\[CrossRef\]](#)
27. Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178. [\[CrossRef\]](#)
 28. Akkol, E.K., Göger, F., Koşar, M., Başer, K.H.C. (2008). Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey. *Food Chemistry*, 108(3), 942-949. [\[CrossRef\]](#)
 29. Miliauskas, G., Venskutonis, P., Van Beek, T. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85(2), 231-237. [\[CrossRef\]](#)
 30. Knez Hrnčič, M., Ivanovski, M., Cör, D., Knez, Ž. (2020). Chia Seeds (*Salvia hispanica* L.): an overview-phytochemical profile, isolation methods, and application. *Molecules*, 25(1), 11. [\[CrossRef\]](#)
 31. Coelho, M.S., Salas-Mellado, M. de las M. (2014). Chemical characterization of chia (*Salvia hispanica* L.) for use in food products. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(5), 263-269. [\[CrossRef\]](#)
 32. Pellegrini, M., Lucas-Gonzalez, R., Sayas-Barberá, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., Viuda-Martos, M. (2018). Bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant capacity of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(1), 47-53. [\[CrossRef\]](#)
 33. de Falco, B., Fiore, A., Bochicchio, R., Amato, M., Lanzotti, V. (2018). Metabolomic analysis by UAE-GC MS and antioxidant activity of *Salvia hispanica* (L.) seeds grown under different irrigation regimes. *Industrial Crops and Products*, 112, 584-592. [\[CrossRef\]](#)
 34. Ghafoor, K., Aljuhaimi, F., Özcan, M.M., Uslu, N., Hussain, S., Babiker, E.E., Fadimu, G. (2018). Effects of roasting on bioactive compounds, fatty acid, and mineral composition of chia seed and oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(10). [\[CrossRef\]](#)



GC-MS ANALYSIS OF ESSENTIAL OIL AND ANTICANCER ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM DISCARDED LEAVES OF *NICOTIANA TABACUM* LINN.

*KULLANILMAYAN NICOTIANA TABACUM LINN. YAPRAKLARINDAN ELDE EDİLEN
UÇUCU YAĞIN GC-MS ANALİZİ VE EKSTRENİN ANTİKANSER AKTİVİTESİ*

Samia HAJJAR^{1,2} , Ali JABER^{1*} , Milad EL RIACHI³ , Fadi ABDEL SATER² ,
Edmond CHEBLE¹ 

¹Laboratoire de Recherche et Développement des Médicaments et des Produits Naturels RDMPN,
Faculty of Pharmacy, Lebanese University, 1500, Beirut, Lebanon.

²Laboratory of Cancer Biology and Molecular Immunology, Lebanese University, Faculty of Sciences,
1500, Hadath-Beirut, Lebanon.

³Department of olive and olive oil, Lebanese Agriculture Research Institute, 18021, Tal Amara,
Lebanon.

ABSTRACT

Objective: *Cancer is still one of the most fatal diseases that threaten human health. Since the effectiveness of conventional cancer therapies based on chemotherapy, radiotherapy, cytotoxic drugs, and surgery is limited by their toxic effects, new therapies are needed. Secondary metabolites from plants exhibit good biological activities. The effect of solvent polarity and method of extraction on the yield of extraction, and the effect of the solvent extract on the biological activities of *Nicotiana tabacum* Linn. leaves extracts were evaluated. The essential oil extract of the leaves will be analyzed as well.*

Material and Method: *Samples of tobacco leaves, grown in Lebanon, were the subject of this work. Two methods of extraction in a series of solvents with decreasing polarities were performed. The antitumor activity was evaluated on breast adenocarcinoma MCF7 cells using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) cytotoxicity assay. The chemical composition analysis was conducted using TLC and GC-MS for essential oil.*

Result and Discussion: *The *Nicotiana tabacum* extracts exhibit anticancer activities, and it is affected by the solvent used. Moreover, the polarity and method of extraction significantly affect the yield of extraction.*

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Ali Jaber
e-mail / e-posta: ali.jaber.2@ul.edu.lb, **Phone / Tel.:** +9613451884

*These results required further investigations on this plant and must be tested on other cancer cell lines. The TLC analysis of different extracts lead us to suggest the presence of α -4,8,13-*duvatriene-1,3-diol*, β -4,8,13-*duvatriene-1,3-diol* and *Z-abienol (Z-AB)*. Totally 19 volatile constituents were detected in *N. tabacum* and the main components were pentadecanal (47.71 %), biosol (15.88 %), solanone (11.06 %), thymol (5.52 %), damascenone (2.16 %), and β -Caryophyllene (2.19 %). As well as that many studies are required to determine the active principles and their mode of action.*

Keywords: Antitumor, essential oil, GC-MS, *Nicotiana tabacum*, solvent polarity

ÖZ

Amaç: *Kanser, günümüzde hala insan hayatını tehdit eden en ölümcül hastalıklardan biridir. Kemoterapi, radyoterapi, sitotoksik ilaçlar ve cerrahiye dayalı geleneksel kanser tedavilerinin etkinliği, toksik etkilerden dolayı sınırlı olduğundan, yeni tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Bitkilerden elde edilen sekonder metabolitler, iyi biyolojik aktivite göstermektedir. Çözücü polaritesi ve ekstraksiyon yönteminin, ekstraksiyonun verimi üzerine etkisi ve ekstraksiyonun *Nicotiana tabacum* Linn. ekstresinin biyolojik aktivitesi üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Bunun yanında, yapraklardan elde edilen uçucu yağın analizi de gerçekleştirilmiştir.*

Gereç ve Yöntem: *Çalışmanın konusu, Lübnan'da yetişen tütün yapraklarından alınan örneklerdir. Azalan polaritede çözücü serisi ile iki ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Antitümör aktivite; meme adenokarsinoma MCF7 hücrelerinde, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) sitotoksitesite testi ile değerlendirilmiştir. Ekstrenin kimyasal içeriği İTK ile, uçucu yağın ise GC-MS ile değerlendirilmiştir.*

Sonuç ve Tartışma: **Nicotiana tabacum* ekstreleri antikanser aktivite göstermiş ve çözücü türünün bu aktiviteyi etkilediği gözlenmiştir. Ayrıca, polarite ve ekstraksiyon yöntemi, ekstraksiyon verimini önemli ölçüde etkilemiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, bitki üzerine daha ileri çalışmalar yapılması ve başka kanser hücre serileri üzerinde testlerin yürütülmesi gerekmektedir. Farklı ekstrelerin İTK analizleri; α -4,8,13-*duvatrien-1,3-diol*, β -4,8,13-*duvatrien-1,3-diol* ve *Z-abienol (Z-AB)* bileşiklerinin varlığını göstermiştir. *N. tabacum* içeriğinde 19 uçucu bileşik tespit edilmiştir ve bunların arasında pentadecanal (47.71 %), biosol (15.88 %), solanon (11.06 %), timol (5.52 %), damasenone (2.16 %), and β -karyofilen (2.19 %) bileşikleri major olarak bulunmaktadır. Bunun yanı sıra aktif bileşiklerin ve etki biçimlerinin belirlenmesi için çok sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.*

Anahtar Kelimeler: Antitümör, çözücü polaritesi, GC-MS, *Nicotiana tabacum*, uçucu yağ

INTRODUCTION

Cancer has become one of the major diseases and problems that have caused predominant death, and it is considered the second cause of death after cardiovascular diseases. This disease is characterized by an uncontrolled multiplication of cells leading to the formation of malignant tumors, with the ability to be metastatic [1-3]. The typical cancer treatment is generally based on using chemotherapy, radiotherapy, cytotoxic drugs, and surgery [4, 5]. These conventional therapies are effective and can even cure many types of cancers including breast cancer, colon, pancreatic, testicular, ovarian, and certain lung cancers, but their effectiveness is often limited by toxic effects [6]. These toxic effects occur when healthy cells are damaged. Among these side effects, fatigue, anemia, bleeding, muscle pain, appetite loss, diarrhea and vomiting, sore throat, constipation, damage to the nervous system, memory and concentration problems, insomnia, and hair loss can be mentioned [4, 7].

Since the current treatments usually have side effects, continued searching for a safer and more effective treatment is needed [8]. For many years' herbal medicines have been used and are still used in developing countries as the primary source of medical treatment [1, 8]. Researchers found that plants

are a great source for developing and producing new, effective, and safe anticancer drugs since it has been shown that they can prevent or reduce the incidence of cancer [9].

As part of the evaluation of Mediterranean endemic species, many studies were interested in the Lebanese *Nicotiana tabacum* (*N. tabacum*), commonly known as tobacco. *N. tabacum* is a perennial herbaceous plant, native to tropical and subtropical America and is now cultivated commercially worldwide [10, 11]. In Lebanon, Tobacco is a very important economic crop; moreover, 25,000 families benefit from the production of tobacco [10, 12]. Over 20 % of tobacco resources are discarded as processing waste [13] because only leaves are used in tobacco industries. The discarded tobacco leaves are scientifically valuable because of their content in bioactive compounds, such as polyphenols, flavonoids, proteins, and aromatic compounds [10, 14, 15]. Many studies have shown that constituents of *N. tabacum* have potential biological activities [16]. For instance, Wang et al. [15] identified the polyphenols in tobacco leaves and investigated their antimicrobial and antioxidant activities. The extraction of phytochemicals from the plant material is influenced by various factors including time, temperature, solvent concentration, and solvent polarity [17]. Moreover, many studies have shown that the biological activities of extracts obtained from plants are affected by solvent polarity [17-19].

The purpose of the recent study was to assess the anticancer activity of the total extracts from the waste of *N. tabacum* growing in Lebanon. The original Saada Six was the class of tobacco studied. It was named by the Regie's Saadiyat Laboratory, developed with a blend of Bulgarian and Azmirly tobacco, planting commenced in 1973 [10, 12]. In addition, the authors investigate whether the anticancer activity is affected by the nature of the solvent and the extraction method used. Extractions were performed using different solvents with different polarities, then the cytotoxic effect of extracts against MCF7 cells, an epithelial human breast cancer cell line was assayed using MTT assay. Furthermore, the components of essential oils from *N. tabacum* were analyzed by GC/MS.

MATERIAL AND METHOD

Materials and Reagents

Methanol (MeOH), ethyl acetate (EtOAc), petroleum ether (PE), dichloromethane (DCM), diethyl ether (Et₂O), hexane, Isopropanol, chloroform, and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma Aldrich (USA). GC-grade *n*-hexane and analytical reagent grade anhydrous sodium sulfate (Na₂SO₄) were used. Samples were weighed using an analytical and numerical balance (Melter Toledo). The dried leaves were grinded using a POLYMIX (PX-MFC 90 D) grind mill. The extracts were concentrated using HEIDOLPH (Germany) rotavapor apparatus. Silica gel 60G F254 Thin Layer Chromatography plates were also purchased from Merck Co., Germany.

Plant Material

The *N. tabacum* plants were grown at the same periods, and harvested in Aitaroun (june 2019), southern Lebanon (33°07'N 35°28'E). The plant material was identified by Prof. Jean HABIB (Professor of Pharmacognosy at the Lebanese University). A voucher specimen (No. 1901) has been deposited at the Pharmacognosy Department, Faculty of Pharmacy of the Lebanese University. After separating the usable leaves to make smoking products (picked by hand at maturity), the remaining waste leaves are dried at room temperature for two weeks and then ground in a laboratory mill. The powders were stored at room temperature in well-closed bags until processing.

Extraction Procedures

The fresh leaves of *N. tabacum* were dried at room temperature and reduced to powder using a mill. To obtain the constituents of *N. tabacum*, a series of separately solid-liquid extractions using six solvents with different polarities (methanol 80 %, methanol, ethyl acetate, dichloromethane, diethyl ether, petroleum ether) were executed.

Two methods of extraction were applied. Briefly, in the first procedure, 10 g of leaves powder and 50 ml of each solvent were put in Erlenmeyer flasks (100 ml) and placed in an ultrasonic cleaning bath (VWR ULTRASONIC CLEANER) operating at a frequency of 35 kHz. Sonication was performed for 60 min. Bath temperature was monitored, and water is replaced almost every 10 min to maintain room temperature ± 2 °C. In parallel, the second procedure was performed by mixing 10 g of plant material and 50 ml of each solvent in Erlenmeyer flasks (100 ml) and macerated using magnetic stirring for 24 hours.

At the end of each extraction procedure, the liquid extract was separated from the solid residue by filtration using Whatman paper. The solid residue was washed using 5 ml of fresh solvent used during extraction. The filtrates were collected the solvent was evaporated in a rotary vacuum evaporator at 40 °C. The resulting *N. tabacum* extracts (NTEs) were stored at 4 °C until use. Each extraction was carried out in triplicate.

Essential Oil's (EO) Content

Foremost, 100 g of the same batch of *N. tabacum* drying leaves were chopped into small pieces then carefully introduced into a 1000 ml round bottom flask containing 500 ml of distilled water. The hydro-distillation was carried out in a Clevenger-type distillation unit designed according to the British Pharmacopoeia specification [20]. After 3 hours of distillation, the EO was collected, and the oils were sealed and kept in dark glass vials in the refrigerator at 4 °C for further analysis.

Determination of Percentage Yield (%)

The extraction yield was calculated according to the following equation (1):

$$\text{Yield \%} = \frac{W_2}{W_1} \times 100 \quad (\text{Equation 1})$$

Where W_1 is the dry weight of the used material and W_2 is the weight of collected extract after evaporation of the solvent.

Thin-Layer Chromatography

To compare qualitatively the constituents of different NTEs, several TLC (thin-layer chromatography) were applied using different mobile phases. TLC is performed on a sheet of aluminum foil coated with a thin layer of adsorbent silica gel, which is commercially available 60 F₂₅₄.

The different mobile phases that were used are: Hexane (100 %), Hexane/EtOAc (75/25 %), Hexane/EtOAc (50/50 %), EtOAc (100%), and isopropanol- chloroform -DCM- hexane (7/8/6/79 %). The crude samples of NTE were spotted onto the TLC plate as a single spot using capillary tubes. After spots drying, the plates were developed in a closed, filter paper-lined, saturated chamber, and the solvent front was allowed to ascend a minimum of 10 cm. The spots were visualized either under UV light and /or by heating plates sprayed with vanillin/sulfuric acid reagent. The retention factor of the compound is calculated as the following equation (2):

$$R_f = \frac{\text{distance traveled by the compound}}{\text{distance traveled by the solvent}} \quad (\text{Equation 2})$$

Determination of Antitumor Activity

Cell Viability

The viability of the MCF7 cells obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) was assessed by MTT assay. MTT is reduced intracellularly in a mitochondrion-dependent reaction to yield insoluble formazan crystals. The ability of cells to reduce MTT indicates mitochondrial activity and serves as a measure of cell viability. Briefly, MCF7 cells, an epithelial human breast cancer cell line, were seeded in 96-well plates (10⁴ cells/well). The following day, cells were treated with the different NTEs at concentrations ranging from 50 to 300 µg.ml⁻¹, and from 0.25 % to 1 % for methanolic extracts, for 48h. After 48 h, 10 µL of MTT solution was added to each well of each plate. After 3 h of incubation at 37 °C, formazan crystals were solubilized with 100 µL of acidified isobutanol. The absorbance was measured spectrophotometrically with an ELISA microplate reader (ELISA reader/Biotech) at 595 nm wavelengths. The number of viable cells was directly correlated to the number of purple formazan crystals formed.

Analyses of Volatile Organic Compounds

One microliter of *N. tabacum* EO sample was diluted (1:100) with hexane and injected into the Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) system. GC SHIMADZU QP2010 system was used to analyze the volatile compounds in the *N. tabacum* extract (without derivatization). DB-5MS (5 % Diphenyl / 95 % Dimethylpolysiloxane) capillary column having (30 m length, 0.25 i.d., film thickness 0.28 μm) and helium as carrier gas (1 ml/min, constant flow) was used for compound separation. The oven temperature was programmed from 65 °C (2 min initial time) increased to 300 °C at 10 °C/min (isothermal for the final time). The actual temperature in the MS source reached 230 °C, and the MS was operated in the electron impact mode at 70 eV ion source energy. The injector temperature was 250°C, while the injection volume was 1 μL and a total run of one hour is performed, mass detector scan range $m/z = 50-550$. Data receipt and processing were performed using Shimadzu GC-MS solution software. The detected compounds were tentatively identified, by MS spectral correlations using NIST08 (National Institute of Standards and Technologies, Mass Spectra Libraries), as well as published data.

Statistical Analysis

The analysis of data was carried out using GraphPad Prism version 5 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA). Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine if the extraction method and the solvent identity influence the extraction yield. Differences between the means of each condition and the control were explored using Paired t-test (Viability test). One-way ANOVA test followed by Dunnett's post- hoc test was used to determine the differences between means to study the effect of solvent polarity and method used on the extraction yield of extracts. Data are presented as means \pm SEM. A probability value of less than 0.05 was regarded as statistically significant.

RESULT AND DISCUSSION

Extraction Yield

Figure 1 shows the effect of the polarity of the solvent and method of extraction on the yield of extraction. Values ranged from 1.3% for the NTE obtained using petroleum ether as a solvent to 21.7% for the extract obtained using methanol as a solvent, and maceration as the method of extraction. The yield of extraction obtained using methanol 80% as the extraction solvent and maceration as the method of extraction presents the highest yield.

Studies have shown that the quantity and quality of the yield of extraction are affected by the polarity, the solvent extract, and the method of extraction [17, 21]. In recent study, two methods of extraction in a series of solvents with decreasing polarities (MeOH 80%, MeOH, EtOAc, DCM, Et₂O,

PE) were conducted. One-way analysis of variance (ANOVA) of the results in this study had shown that the solvent identity, in other words, the polarity of the solvent, significantly affects the yield of extraction ($p=0.0001<0.005$). Moreover, the extraction yield is also affected by the polarity of solvents, showing the highest yield to the lowest yield as per the following manner: MeOH 80% > MeOH > EtOAc > DCM > Et₂O > PE. This agrees with previous studies that also had shown that extraction in highly polar solvents resulted in a high extract yield compared to non-polar ones [17, 22]. Additionally, two-way ANOVA showed that the nature of the solvent and the method of extraction independently significantly affect the yield of extraction ($p=0.0001<0.005$), also they interact and significantly affect the yield ($p<0.005$).

Furthermore, it showed that the solvent identity affects the yield more than the method of extraction. Therefore, this difference in the percentages of yield between the extracts is due to the polarity of the solvent and the method of extraction.

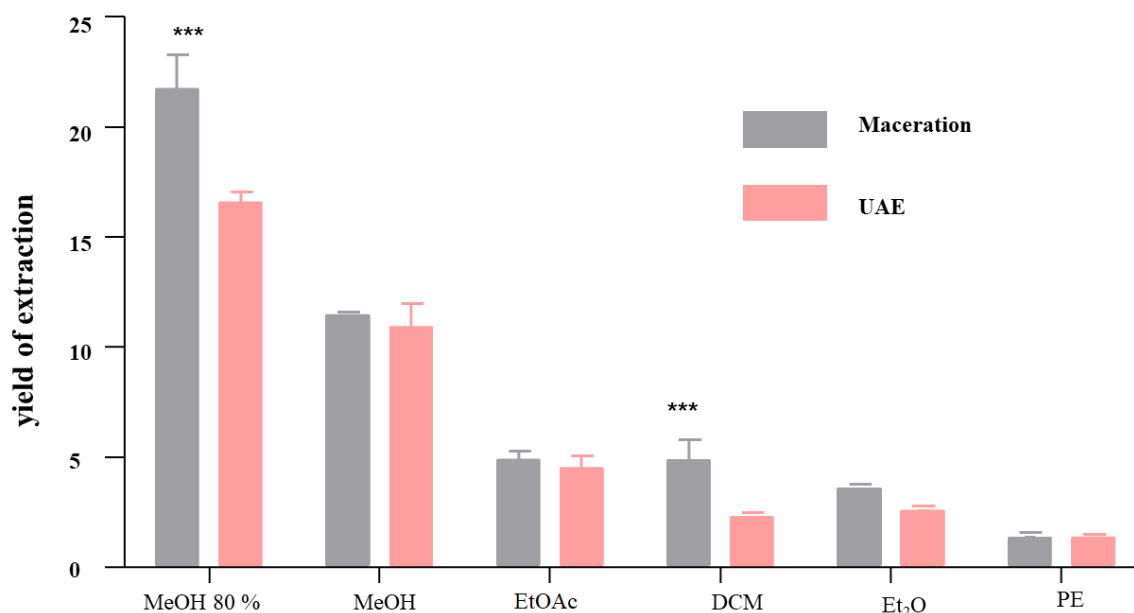


Figure 1. Effect of solvent polarity and method of extraction on the extraction yield of NTEs

Bars represent means \pm SEM. The significant difference between means was represented by ***P value ≤ 0.0001 . (n=3).

Thin-Layer Chromatography

In order to compare the chemicals contained in the NTEs obtained, a thin-layer chromatography analysis was executed. Briefly, appropriate volumes of extracts were applied on Silica G TLC plates using capillaries, then these plates were wetted in five different mobile phases systems. The four systems of mobile phases composed by a combination of hexane and ethyl acetate (0-25 %-50 %-75 % hexane) present similar results, represented by the TLC in Figure 2. TLC shows that extracts obtained using all

solvents in both methods of extraction except the petroleum ether (E, F) present similar compounds. Moreover, after migration, the TLC plates were sprayed with vanillin/sulfuric acid reagent, which transforms the color of the highest spot present in all solvents, except the petroleum ether, to blue. This colored transformation based on previous studies [23] indicates the presence of terpenoids or steroids. Additionally, it completely agrees with several studies that have demonstrated the presence of terpenoids and steroids in the extracts from *N. tabacum* leaves [24, 25]. It is worth noting that all the spots that appeared under 254 nm also came out under 366 nm, but under the latter wavelength additional spots were detected, specifically those that didn't migrate too much and remained near the spotting point.



Figure 2. TLC plate under UV 366 nm, using Hexane/ EtOAc as eluent

A: UAE, MeOH; B: maceration, MeOH; C: UAE, EtOAc; D: maceration, EtOAc; E: UAE, PE; F: maceration, PE; G: UAE, MeOH 80%; H: maceration, MeOH 80%; I: UAE, DCM; J: maceration, DCM; K: UAE, Et₂O; L: maceration, Et₂O.

Figure 3 shows the TLC plate observed under UV at 366 nm using a mobile phase composed of a combination of isopropanol-chloroform-dichloromethane-hexane (7:8:6:79). This new mobile phase has allowed the separation of more compounds compared to the first four ones. In comparison with a previous study to detect and quantify components in the leaf of *N. tabacum* [26], this study identify the presence of sucrose esters (SE) at $R_f = 0.05$ in extracts obtained using UAE methanolic extract and those obtained using EtOAc, PE, DCM, and Et₂O in both methods of extractions. Also, by comparison of the R_f s obtained in the literature using the same mobile phase system, the authors suggest the presence of α -4,8,13-duvatriene-1,3-diol (ADVT) at $R_f = 0.22$ in extracts obtained using EtOAc, DCM, and Et₂O. β -4,8,13-duvatriene-1,3-diol (BDVT) was identified at $R_f = 0.25$ in the methanolic extracts (MeOH, MeOH 80 %), and Z-abienol (Z-AB) at $R_f = 0.63$ in all extracts except extracts obtained using MeOH. This variety in compounds is due to the difference in polarity between solvents, and it will cause a difference in the biological activities of extracts.

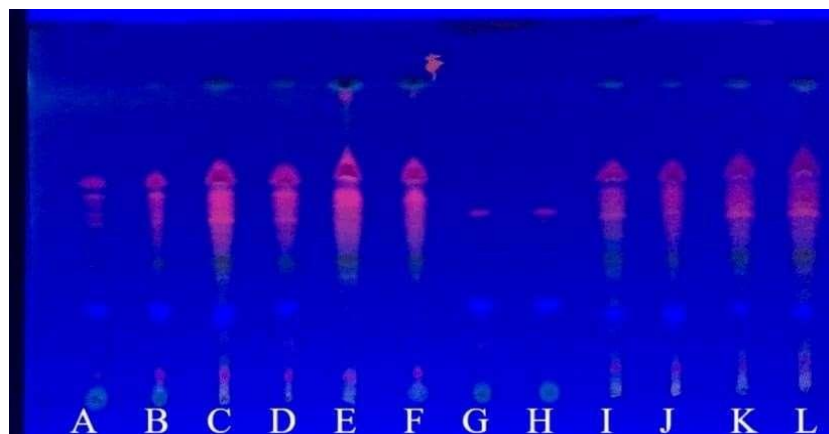


Figure 3. TLC plate under UV 366 nm, using isopropanol/chloroform/DCM/hexane as eluent

A: UAE MeOH; B: maceration MeOH; C: UAE EtOAc; D: maceration EtOAc; E: UAE PE; F: maceration PE; G: UAE MeOH 80%; H: maceration MeOH 80%; I: UAE DCM; J: maceration DCM; K: UAE Et₂O; L: maceration Et₂O.

Determination of Antitumor Activity

The effects of various NTEs were evaluated on breast adenocarcinoma MCF7 cells using MTT cytotoxicity assay. This is a colorimetric assay in which the yellow substrate MTT is reduced to purple formazan crystal produced only by succinate dehydrogenase enzymes in viable cells, that are metabolically active [10]. The amount of the formed formazan is proportional to the concentration of viable cells in the sample. MCF7 cancer cells were treated with different concentrations (50-300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) of various extracts and (0.25 %-1 %) of methanolic extracts for 48 h. The extract obtained using EtOAc and maceration as a method of extraction exerted no significant effect on cell viability in all tested conditions (Figure 4 A). All others extract exerted a significant effect on cell viability in all tested conditions (Figure 4). In the case of methanolic extracts (Figure 4-E and F), IC₅₀ cannot be determined in this study because for all concentrations tested, the percentage of viability is less than 50. To determine the IC₅₀ for the methanolic extracts, a smaller range of concentrations must be tested. In the case of extracts with DCM using UAE as the method of extraction (Figure 4 C), Et₂O using maceration as a method of extraction (Figure 4 D), and EtOAc using UAE as a method of extraction (Figure 4-B) IC₅₀ are respectively 157,6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 246.7 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ and 238.9 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Based on the IC₅₀s, extract obtained with DCM is more potent and caused more inhibition of cell viability than extracts obtained using Et₂O and EtOAc. The extracts that exhibit the higher potent inhibitory activity are the methanolic extracts (Figure 4-E and F) which are obtained using the most polar solvents. These findings are in agreement with previous studies, where flavonoid of tobacco leaves cultivated in Indonesia with concentrations of 160 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ show a decrease of the MCF-7 cell viability of more than 50 %, with an IC₅₀ value of 148.41 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [27]. Other studies, covering isolated compounds from *N. tabacum*, found weak to moderate inhibitory activities against MCF7 cell lines ranging from 6.2 to 44 μM [14, 28-31].

On the other hand, the nature of used solvent significantly affects the antitumor activity of extracts, which agrees with previous studies that have shown that the solvent affects the biological activities of extracts [16–19]. To see if more polar solvents exhibit better biological activities, more studies are needed, since DCM and Et₂O are less polar than EtOAc and exhibit better antitumor activity. Additionally, the best results (Figure 4) are promoted by the most polar solvents: MeOH, and MeOH 80 %.

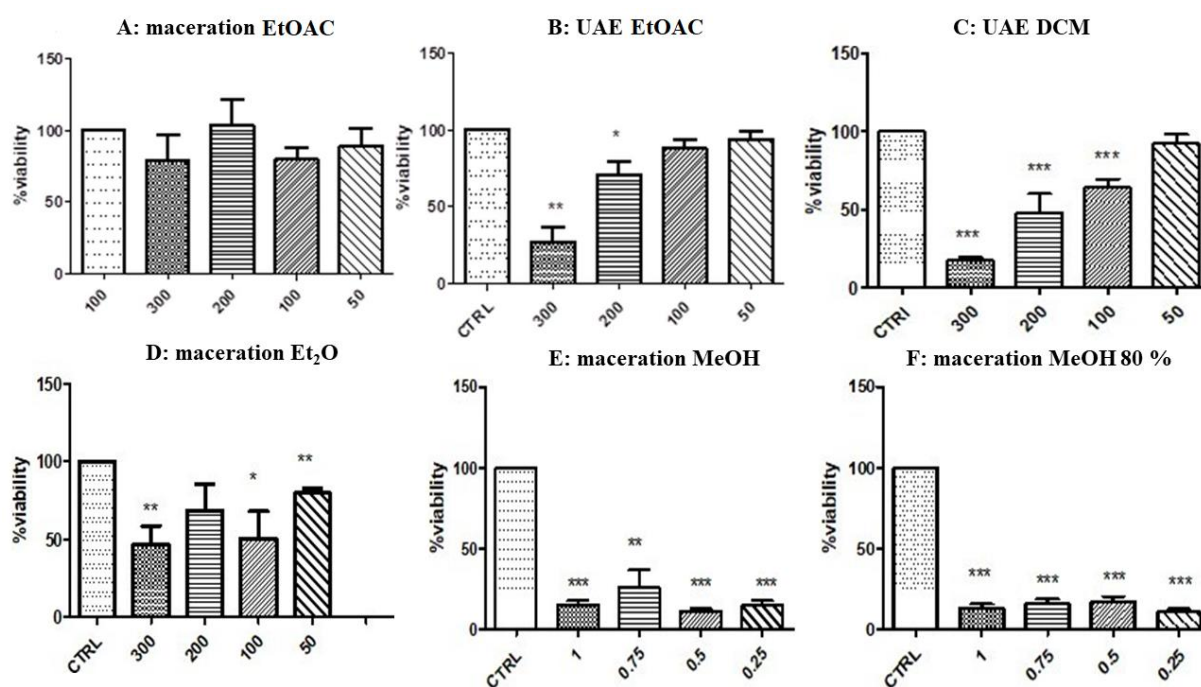


Figure 4. Effect of NTEs on MCF7 cell proliferation

Bar values are reported as mean \pm SEM of at least three independent experiments. Significant differences in expression are indicated by * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), and *** ($P < 0.001$) as compared to control (untreated cells).

On the other hand, the essential oil from leaves of *N. tabacum* (EONts) was analyzed by GC–MS (Figure 5) to detect volatile, small, and non-thermolabile metabolites. The composition of EONt was determined and the % area of individual components is given in Table 1. Results showed the detection of 19 constituents from *N. tabacum* constituting 89.78 % of the total content. The main constituents (over 2 %) were pentadecanal (47.71 %), biosol (15.88 %), solanone (11.06 %), thymol (5.52 %), damascenone (2.16 %), and β -Caryophyllene (2.19 %).

The analysis of the available data about EONts compositions revealed that some compounds were found for the first time in EONt. While no precedent studies mention the presence of pentadecanal in EONts it has been shown that the leaf EO of *Solanum macranthum*, a plant from the same family (solanaceae) of *N. tabacum*, contains pentadecanal 28.1 % [32]. (E)- β -farnesene, carophylline and α -

terpineol were also detected between the volatile compounds from flowers of *N. tabacum* [33]. Moreover, damascenone, a carotenoid derived compound, is described as a powerful fruity-floral odor complex, was found in the work of Popova et al. [34]. In another paper, Popova et al. indicate the presence of solanone (0.48 %) in *N. tabacum* flue-cured Virginia type, β -caryophyllene (0.48 %) and β -farnesene (0.08 %) [35]. In the EO of the variety “Plovdiv 7” of Bulgarian oriental tobacco, nineteen volatile components were identified (92.3%), where (E)-phytol (53.4%) was the major compound followed by solanone (6.8%), β -damascenone (3.7 %) and β -caryophyllene (0.2 %) were also present [36].

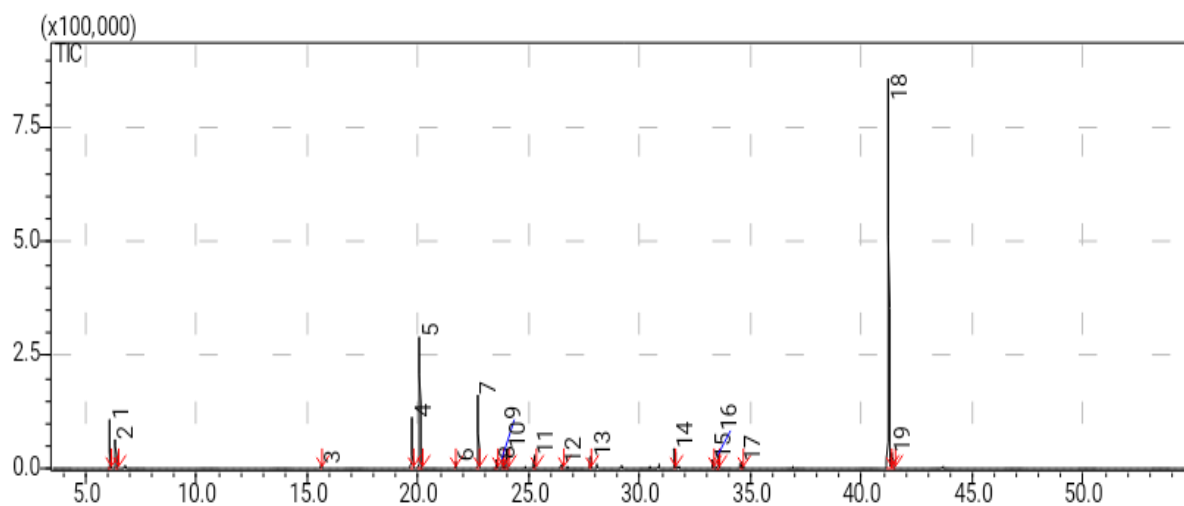


Figure 5. GC–MS chromatogram of essential oil from leaves of *N. tabacum*

Table 1. Chemical composition of the essential oils of *N. tabacum*

Compound	RT	Formula	% Area	Similarity (%)
α -Terpineol	15.633	C ₁₀ H ₁₈ O	0.7	59
Thymol	19.717	C ₁₀ H ₁₄ O	5.52	90
Biosol	20.067	C ₁₀ H ₁₄ O	15.88	80
Solanone	22.696	C ₁₃ H ₂₂ O	11.06	92
Damascenone	23.533	C ₁₃ H ₁₈ O	2.16	69
(E)- β -Farnesene	23.8	C ₁₅ H ₂₄	0.97	93
β -Caryophyllene	25.233	C ₁₅ H ₂₄	2.19	93
Trifluoroacetyl-lavendulol	26.45	C ₁₂ H ₁₇ F ₃ O ₂	1.5	69
Germacrene -d	27.775	C ₁₅ H ₂₄	0.5	93
But-2-enoic anhydride	28.067	C ₈ H ₁₀ O ₃	0.79	87
Pentadecanal	41.083	C ₁₅ H ₃₀ O	47.71	68
Cyclodecanone	41.367	C ₁₀ H ₁₈ O	0.8	83

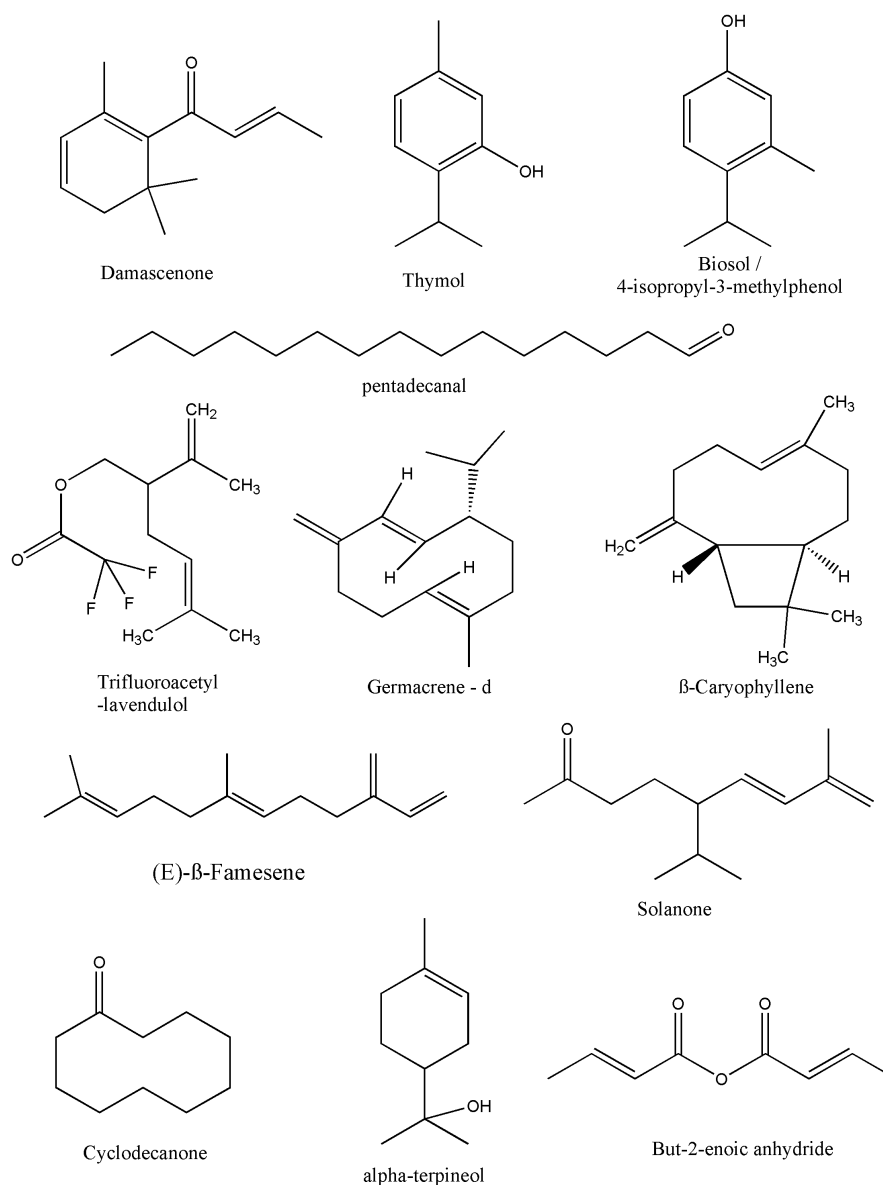


Figure 6. Chemical structures of compounds found in *N. tabacum* EO's

Among these, many compounds are biologically active compounds and others have aroma characteristics. Solanone, Trifluoroacetyl-lavendulol and damascenone are the major contributor of *N. tabacum* aroma. Thymol, (E)- β -Famesene, own antimicrobial activity [38]. While the sesquiterpene “germacrene-d” is known as an antiproliferative agent against leukemia and melanoma [39]. Another sesquiterpene “ β -Caryophyllene” has anticancer activity [40].

Differences in bioactivity and essential oils content from previous studies on tobacco from different varieties and origins [34, 41-44] were probably due to the genetic factor (variety) as well as to abiotic factors influencing plant development and metabolism and the uniqueness of SAADA 6. Since tobacco plants are thermophilic crop plants originating from tropical regions they are sensitive to the change of temperature [45].

According to the present study, results have demonstrated that discarded leaves from *N. tabacum* present anticancer activities and those activities are affected by the solvent used. The anticancer activities are attributed to the bioactive compounds present in *N. tabacum* leaves. The observed variation between extracts is due to the quantity and variety of compounds that can each solvent extract. All these results suggest that *N. tabacum* leaves can be a rich source of bioactive compounds that exhibit antitumor activities. Further studies are required to identify the active compounds and their mechanism of action. TLC and GC-MS analysis are conducted to identify the content of extract and some compounds have been identified by comparison to the literature and library. Also, these extracts should be tested on other cancer cell lines and normal cell lines. Furthermore, *in vivo* evidence for their biological activities is needed. Therefore, more research should be conducted to determine the potential utility of recycling waste tobacco. So, the authors hope to transform the tobacco plant from the source of cancer to a source of anticancer drugs.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Lebanese University (Faculty of Pharmacy and Faculty of Sciences)-Lebanon for providing all chemicals and products necessary to carry out this project. The GC-MS spectra were performed at the Lebanese Agricultural Research Institute Laboratory. The assistance of the staff is gratefully appreciated.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: A.J., F.A.S., E.C.; Design: A.J., F.A.S., E.C.; Control: A.J., M.E.R., F.A.S., E.C.; Materials: S.H., A.J., M.E.R., F.A.S., E.C.; Data Collection and/or processing: S.H., A.J.; Analysis and/or interpretation: S.H., A.J., M.E.R., F.A.S., E.C.; Literature review: S.H., A.J.; Manuscript writing: S.H., A.J.; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

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

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

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

REFERENCES

1. Wang, H., Khor, T.O., Shu, L., Su, Z., Fuentes, F., Lee, J-H., Kong, A-N.T. (2012). Plants against cancer: A review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 12, 1281-1305. [CrossRef]
2. Ochwang'i, D.O., Kimwele, C.N., Oduma, J.A., Gathumbi, P.K., Mbaria, J.M., Kiama, S.G. (2014). Medicinal plants used in treatment and management of cancer in Kakamega County, Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 151, 1040-1055. [CrossRef]
3. Greenwell, M., Rahman, P.K.S.M. (2015). Medicinal plants: Their use in anticancer treatment. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6, 4103-4112. [CrossRef]
4. Aiello, P., Sharghi, M., Mansourkhani, S.M., Ardekan, A.P., Jouybari, L., Daraei, N., Peiro, K., Mohamadian, S., Rezaei, M., Heidari, M., Peluso, I., Ghorat, F., Bishayee, A., Kooti, W. (2019). Medicinal plants in the prevention and treatment of colon cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, e.2075614. [CrossRef]
5. O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R., Folkman, J. (1997). Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88, 277-285. [CrossRef]
6. The American Cancer Society medical and editorial content team Chemotherapy Side Effects. Retrieved from <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/chemotherapy-side-effects.html>. Accessed date 09.08.2021.
7. Cragg, G.M., Newman, D.J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 72-79. [CrossRef]
8. Sivaraj, R., Rahman, P.K.S.M., Rajiv, P., Narendhran, S., Venckatesh, R. (2014). Biosynthesis and characterization of *Acalypha indica* mediated copper oxide nanoparticles and evaluation of its antimicrobial and anticancer activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 129, 255-258. [CrossRef]
9. Bassam, H. (2019). Plants and Cancer Treatment, *Medicinal Plants - Use in Prevention and Treatment of Diseases*, Bassam Abdul Rasool Hassan, Intech Open. Retrieved from <https://www.intechopen.com/chapters/70522>. Accessed date 09.08.2021.
10. Jaber, A., Soukariyeh, R., Khalil, A., Abdel-Sater, F., Cheble, E. (2020). Biological activities of total oligomeric flavonoids enriched extracts of *nicotiana tabacum* from eight lebanese regions. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 6, 70-77. [CrossRef]
11. Rawat, A., Mal, R. (2013). Phytochemical properties and pharmacological activities of *Nicotiana tabacum*. *Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research* 1, 74-82. [CrossRef]
12. Régie Libanaise des tabacs et tombacs Tobacco's economic contribution. In: REGIE LIBANAISE Tab. TOMBACS. Retrieved from <https://www.rltt.com.lb/Article/31/tobaccos-economic-contribution/en>. Accessed date 09.08.2021.
13. Sharma, Y., Nagar, A., Srivastava, N., Dua, D. (2016). Antibacterial activity, phytochemical screening and antioxidant activity of stem of *nicotiana tabacum*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7, 1156-67. [CrossRef]

14. Zhang, X., Gao, H., Zhang, L., Liu, D., Ye, X. (2012). Extraction of essential oil from discarded tobacco leaves by solvent extraction and steam distillation and identification of its chemical composition. *Industrial Crops and Products*, 39, 162-169. [\[CrossRef\]](#)
15. Wang, H., Zhao, M., Yang, B., Jiang, Y., Rao, G. (2008). Identification of polyphenols in tobacco leaf and their antioxidant and antimicrobial activities. *Food Chemistry*, 107, 1399-1406. [\[CrossRef\]](#)
16. Ameya, G., Manilal, A., Merdekios, B. (2017). In vitro antibacterial activity and phytochemical analysis of *Nicotiana tabacum* L. extracted in different organic solvents. *Open Microbiologie Journal*, 11, 352-359. [\[CrossRef\]](#)
17. Nawaz, H., Shad, M., Rehman, N., Andaleeb, H., Ullah, N. (2020). Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56, e.17129. [\[CrossRef\]](#)
18. Thouri, A., Chahdoura, H., El Arem, A., Omri Hichri, A., Ben Hassin, R., Achour, L. (2017). Effect of solvents extraction on phytochemical components and biological activities of Tunisian date seeds (var. Korkobbi and Arehti). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, 248. [\[CrossRef\]](#)
19. Nawaz, H., Aslam, M., Muntaha, S.T. (2019). Effect of solvent polarity and extraction method on phytochemical composition and antioxidant potential of corn silk. *Free Radicals and Antioxidants*, 9, 5-11. [\[CrossRef\]](#)
20. British Pharmacopoeia Commission. (1980). British Pharmacopoeia, Her Majesty's Stationery Office, Atlantic House, Holborn Viaduct, London.
21. Wakeel, A., Jan, S.A., Ullah, I., Shinwari, Z.K., Xu, M. (2019). Solvent polarity mediates phytochemical yield and antioxidant capacity of *Isatis tinctoria*. *PeerJ Life and Environment*, 7, 1-19. [\[CrossRef\]](#)
22. Karabegović, I.T., Veljković, V.B., Lazić, M.L. (2011). Ultrasound-assisted extraction of total phenols and flavonoids from dry tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves. *Natural Product Communications*, 6, 1855-1856. [\[CrossRef\]](#)
23. Pyka, A. (2014). Detection progress of selected drugs in TLC. *BioMed Research International*, 732078. [\[CrossRef\]](#)
24. Jijhotiya, A., Singhal, D.M., Goyal, D.S. (2017). Preliminary phytochemical screening of leaves extracts of *Nicotiana tabacum*. *International Journal of Engineering Technology Science and Research*, 4(6), 56-61.
25. Oeung, S., Nov, V., Ung, H., Roum, K., Yin, V., Keo, S., Chea, S. (2017). Phytochemical analysis of different extracts of leaves of *Nicotiana tabacum* L. of Cambodia. *Asian Journal of Pharmacognosy*, 1, 18-26. [\[CrossRef\]](#)
26. Lawson, D.R., Danehower, D.A. (1989). Quantitative thin-layer chromatography of *Nicotiana tabacum* leaf surface components. *Journal of Chromatography A*, 463, 429-440. [\[CrossRef\]](#)
27. Kusumawardani, B., Febi, Q.N., Rosidah, M., Azis, D.A., Puspitasari, E., Nugraha, A.S. (2020). Cytotoxic potential of flavonoid from *Nicotiana tabacum* leaves on MCF-7 human breast cancer cells. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 11, 97-102. [\[CrossRef\]](#)

28. Shang, S., Shi, J., Tang, J., Jiang, J., Zhao, W., Zheng, X., Lei, P., Han, J., Wang, C., Yuan, D., Yang, G., Chen, Y., Miao, M. (2019). New isolates from leaves of *Nicotiana tabacum* and their biological activities. *Natural Product Research*, 33, 1577-1583. [\[CrossRef\]](#)
29. Zhou, M., Zhou, K., Lou, J., Wang, Y-D., Dong, W., Li, G-P., Jian, Z-Y., Du, G., Yang, H-Y., Li, X-M., Hu, Q-F. (2015). New biphenyl derivatives from the leaves of *Nicotiana tabacum* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry Letters*, 14, 226-229. [\[CrossRef\]](#)
30. Chen, J., Leng, H., Duan, Y., Zhao, W., Yang, G., Guo, Y., Chen, Y., Hu, Q. (2013). Three new flavonoids from the leaves of oriental tobacco and their cytotoxicity. *Phytochemistry Letters*, 6, 144-147. [\[CrossRef\]](#)
31. Jassbi, A.R., Vafapour, M., Shokrollahi, A., Firuzi, O., Zare, M., Chandran, J.N., Schneider, B., Baldwin, I.T. (2017). Cytotoxic activity of two cembranoid diterpenes from *Nicotiana glauca* against three human cancer cell lines. *The Open Bioactive Compounds Journal*, 5, 1-8. [\[CrossRef\]](#)
32. Essien, E.E., Ogunwande, I.A., Setzer, W.N., Ekundayo, O. (2012). Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxicity studies on *S. erianthum* and *S. macranthum* essential oils. *Pharmaceutical Biology*, 50, 474-480. [\[CrossRef\]](#)
33. Loughrin, J.H., Hamilton-Kemp, T.R., Andersen, R.A., Hildebrand, D.F. (1990). Headspace compounds from flowers of *Nicotiana tabacum* and related species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 455-460. [\[CrossRef\]](#)
34. Popova, V., Ivanova, T., Prokopov, T., Nikolova, M., Stoyanova, A., Zheljazkov, V.D. (2019). Carotenoid-related volatile compounds of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) essential oils. *Molecules*, 24(19), 3446. [\[CrossRef\]](#)
35. Popova, V., Ivanova, T., Stoyanova, A., Nikolova, V., Hristeva, T., Zheljazkov, V.D. (2020). GC-MS Composition and olfactory profile of concretes from the flowers of four *Nicotiana* species. *Molecules*, 25, 2617. [\[CrossRef\]](#)
36. Popova, V., Ivanova, T., Stoyanova, A., Georgiev, V., Hristeva, T., Nikolova, V., Docheva, M., Nikolov, N., Damyanova, S. (2018). Phytochemicals in leaves and extracts of the variety "Plovdiv 7" of Bulgarian oriental tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Trends in Phytochemical Research*, 2(1), 27-36. [\[CrossRef\]](#)
37. Babushok, V.I., Linstrom, P.J., Zenkevich, I.G. (2011). Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 40, 043101. [\[CrossRef\]](#)
38. Candelaria-Dueñas, S., Serrano-Parrales, R., Ávila-Romero, M., Meraz-Martínez, S., Orozco-Martínez, J., Ávila-Acevedo, J.G., García-Bores, A.M., Cespedes-Acuña, C.L., Peñalosa-Castro, I., Hernandez-Delgado, T. (2021). Evaluation of the antimicrobial activity of some components of the essential oils of plants used in the traditional medicine of the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Puebla, México. *Antibiotics*, 10, 295. [\[CrossRef\]](#)
39. Dutra, R.C., Pittella, F., Dittz, D., Marcon, R., Pimenta, D.S., Lopes, M.T.P., Raposo, N.R.B. (2012). Chemical composition and cytotoxicity activity of the essential oil of *Pterodon emarginatus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22, 971-978. [\[CrossRef\]](#)

40. Francomano, F., Caruso, A., Barbarossa, A., Fazio, A., La Torre, C., Ceramella, J., Mallamaci, R., Saturnino, C., Iacopetta, D., Sinicropi, M.S. (2019). β -Caryophyllene: A sesquiterpene with countless biological properties. *Applied Sciences* 9, 5420. [\[CrossRef\]](#)
41. Popova, V., Ivanova, T., Stoyanova, A., Nikolova, V., Hristeva, T., Gochev, V., Yonchev, Y., Nikolov, N., Zheljazkov, V.D. (2020). Terpenoids in the essential oil and concentrated aromatic products obtained from *Nicotiana glutinosa* L. leaves. *Molecules*, 25, 30. [\[CrossRef\]](#)
42. Alagić, S., Selekcija, I.S., Palić, R., Stojanović, G., Nikolić, M. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of the oriental tobacco yaka. *Journal of Essential Oil Research*, 14, 230-232. [\[CrossRef\]](#)
43. Popova, V., Ivanova, T., Nikolova, V., Stoyanova, A., Docheva, M., Hristeva, T., Damyanova, S., Nikolov, N. (2017). Biologically active and volatile compounds in leaves and extracts of *Nicotiana glauca* Link & Otto from Bulgaria. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9, 2045-2051. [\[CrossRef\]](#)
44. Palic, R., Stojanovic, G., Alagic, S., Nikolic, M., Lepojevic, Z. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil and CO₂ extracts of the oriental tobacco, Prilep. *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 323-326. [\[CrossRef\]](#)
45. Yang, L.Y., Yang, S.L., Li, J.Y., Ma, J.H., Pang, T., Zou, C.M., He, B., Gong, M. (2018). Effects of different growth temperatures on growth, development, and plastid pigments metabolism of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants. *Botanical Studies*, 59, 5. [\[CrossRef\]](#)



SYNTHESIS, PROPERTIES AND BIOLOGICAL POTENTIAL SOME CONDENSED DERIVATIVES 1,2,4-TRIAZOLE

BAZI 1,2,4-TRIAZOL YOĞUNLAŞTIRILMIŞ TÜREVLERİNİN SENTEZİ, ÖZELLİKLERİ VE
BİYOLOJİK POTANSİYELİ

Andrey GOTSULYA^{1*} , Yevhen ZAIKA² , Tetiana BRYTANOVA¹ 

¹Zaporizhzhia State Medical University, Faculty of Pharmacy, Department of Natural Sciences for
Foreign Students and Toxicological Chemistry, 69035, Zaporizhzhia, Ukraine

²Enamine Ltd, 02094, Kyiv, Ukraine

ABSTRACT

Objective: *The aim of the work was to develop effective methods for the synthesis of biologically active heterocyclic systems containing pyrrole, indole and 1,2,4-triazole. In this study, firstly fourteen [1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazoles compounds requiring for this study were synthesized.*

Material and Method: *Chemical structures of synthesized compounds were characterized with elemental analysis, ¹H NMR, LC-MS techniques. The biological potential of the synthesized substances was estimated by the molecular docking method.*

Result and Discussion: *An optimal method for the synthesis of [1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazoles has been developed. In molecular modeling studies, the compounds were found to be similar to known drugs in some respects. Besides, the interaction of each molecule in the active site of the crystal structures of cyclooxygenase-1, lanosterol 14- α -demethylase, kinases of anaplastic lymphoma were considered as in silico.*

Keywords: *Docking, indole, pyrrole, synthesis, 1,2,4-triazole*

ÖZ

Amaç: *Çalışmanın amacı 1,2,4-triazol, indol ve pirol içeren biyolojik olarak aktif heterosiklik sistemlerin sentezi için etkili yöntemler geliştirmektir. Bu çalışmada, öncelikle çalışma için gerekli olan on üç adet [1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol bileşiği sentezlenmiştir.*

Gereç ve Yönetim: *Sentezlenen bileşiklerin kimyasal yapıları elementel analiz, ¹H NMR, LC-MS teknikleri ile karakterize edildi. Sentezlenen maddelerin biyolojik potansiyelleri, moleküler yerleştirme yöntemi ile tahmin edildi.*

Sonuç ve Tartışma: *[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazollerin sentezi için optimal bir yöntem geliştirildi. Moleküler modelleme çalışmalarında, bileşiklerin bazı açılardan bilinen ilaçlara benzer olduğu*

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Andrey Gotsulya
e-mail / e-posta: andrey.gotsulya@gmail.com, **Phone / Tel.:** +380990425382

bulunmuştur. Ayrıca her bir molekülün siklooksijenaz-1, lanosterol 14- α -demetilaz ve anaplastik lenfoma kinazların kristal yapılarındaki aktif bölgeler ile etkileşimi in siliko olarak değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: *İndol, moleküler modelleme, pirol, sentez, 1,2,4-triazol*

INTRODUCTION

The search for biologically active substances among 1,2,4-triazole derivatives and the creation of a drug based on them is a promising area of research [1-5]. Synthesis of 1,2,4-triazoles fused to another heterocyclic ring has attracted wide spread attention due to their diverse applications as antibacterial [6], anticonvulsant [6], antidepressant [7], antiviral [8], anti-inflammatory [9], antinociceptive [10], anti-diabetic and antioxidant [11], anticancer [12] agents. In addition, the structure of 1,2,4-triazole is resistant to metabolic transformations and is able to participate in the formation of intermolecular chemical bonds [13]. In addition, 1,2,4-triazole derivatives have low toxicity, good pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters [8]. The synthesis of new condensed 1,2,4-triazole derivatives can improve existing biological properties or contribute to the emergence of new valuable properties [14].

Among the great variety of derivatives of this heterocyclic system, special attention is paid to the cyclocondensation products of 4-amino-1,2,4-triazole-3-thiol derivatives with various reagents [15-22]. It is reported that many derivatives of indole and pyrrole obtained on the basis of 1,2,4-triazole as the main structure are of interest for pharmaceutical research purposes [23].

The combination of 4-amino-1,2,4-triazole-3-thiol with pyrrole or indole allows to obtain 4-amino-5-heteryl-1,2,4-triazole-3-thiols, which in the reactions of heterocyclization with aromatic carboxylic acids form [1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazoles.

However, despite the large number of studies, the search for selective methods of obtaining triazolo[b]thiadiazole has not lost its relevance.

The aim of the work was the synthesis of heteryl derivatives [1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole, study of their physicochemical properties and determination of their biological potential.

MATERIAL AND METHOD

Chemistry

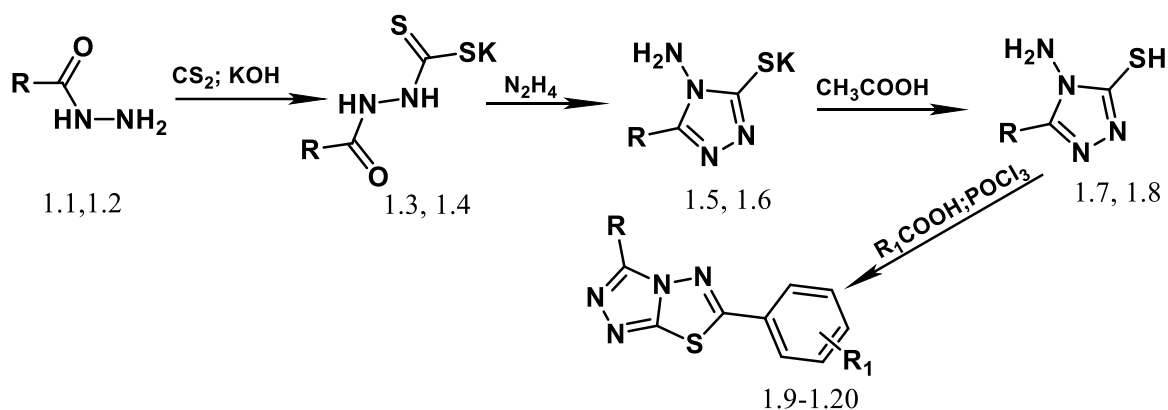
Pyrrole and indole-3-carboxylic acid were used as starting materials to obtain the target reaction products.

Stepwise conversion of pyrrole to pyrrole-2-carbohydrazide described in earlier works [31].

For the synthesis of 5-(3-(indole-3-yl)-4-amino-1,2,4-triazole-3-thiol), the reaction of the potassium salt of indole-3-carboxylic acid with bromoethane was previously carried out, which allowed to obtain the corresponding ester.

The formed 5-heterorol derivatives of 4-amino-1,2,4-triazole-3-thiols were subsequently used in reactions with aromatic and heterocyclic carboxylic acids in the presence of phosphoryl trichloride (Figure 1).

Melting points were determined in open capillary tubes in a “Stanford Research Systems Melting Point Apparatus 100” (SRS, USA). The elemental analysis (C, H, N) were performed using the “Elementar vario EL cube” analyzer (Elementar Analysensysteme, Germany). ¹H NMR spectra (400 MHz) were recorded at “Varian-Mercury 400” spectrometer with SiMe₄ as internal standard in DMSO-d₆ solution. Chromatography-mass spectral studies were conducted on the instrument “Agilent 1260 Infinity HPLC” equipped with a mass spectrometer “Agilent 6120” (method of ionization – electrospray (ESI)).



R = pyrrole-2-yl (1.1, 1.3, 1.5, 1.7, 1.9-1.14), 3-(indole-3-yl)methyl (1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 1.15-1.20);
 R₁ = C₆H₅, C₆H₄-2-OCH₃, C₆H₄-3-OCH₃, C₆H₃-2-Br-5-OCH₃, C₆H₃-2-Br-4-F, C₆H₃-2-Cl-5-NO₂

Figure 1. The synthetic route of title compounds

Potassium 2-(pyrrole-2-carbonyl)hydrazine-1-carbodithioate (1.3). To 0.029 mol (1.6 g) of potassium hydroxide pre-dissolved in 20 ml of butan-1-ol is added 0.01 mol (1.25 g) of pyrrole-2-carbohydrazide. Stir until the precipitate dissolves, after which the flask with the solution is placed on crushed ice. Continuing stirring, 0.011 mol (0.84 g) of carbon disulfide was added dropwise. The yellow precipitate formed is continued to stir for 14 h at room temperature, then filtered and washed with diethyl ether. Yield - 85%.

Potassium 2-(indole-3-carbonyl)hydrazine-1-carbodithioate (1.4). To 0.029 mol (1.6 g) of potassium hydroxide pre-dissolved in 20 ml of butan-1-ol is added 0.01 mol (1.75 g) of indole-3-carbohydrazide. Stir until the precipitate dissolves, after which the flask with the solution is placed on

crushed ice. Continuing stirring, add dropwise 0.011 mol (0.84 g) of carbon disulfide. The yellow precipitate formed is continued to stir for 14 h at room temperature, then filtered and washed with diethyl ether and dried in vacuum. Compound 1.4 was obtained in quantitative yield. Synthesized potassium 2-(indole-3-carbonyl)hydrazine-1-carbodithioate was used for the preparation 4-amino-5-(indole-3-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol without additional purification.

4-Amino-5-(pyrrole-2-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol (1.7). To 0.01 mol (2.39 g) of potassium 2-(pyrrole-2-carbonyl)hydrazine-1-carbodithioate, add 0.02 mol of 64 % hydrazine hydrate solution and boil for 5 h on a water heater. The solution is cooled, 10 ml of purified water is added and neutralized with acetic acid to pH = 7. The precipitate is filtered off, washed twice with 50 g of water and dried. White powder, m. p. 188-190 °C. Yield: 52 %.

4-Amino-5-(indole-3-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol (1.8). In a flask equipped with a mixer, refrigerator, thermometer load 0.01 mol (2.89 g) potassium 2-(indole-3-carbonyl)hydrazine-1-carbodithioate, add 0.02 mol of 64 % solution of hydrazine hydrate and boil for 5 hours on a water heater. The solution is cooled, 10 ml of purified water is added and neutralized with acetic acid to pH = 7. The precipitate is filtered off, washed twice with 50 g of water and dried. This product was recrystallized from ethanol. Light brown powder, m. p. 256-258 °C. Yield: 86 %.

General synthetic procedure for 3,6-disubstituted-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazoles (1.9-1.20). A mixture of corresponding 4-amino-5-substituted-1,2,4-triazole-3-thiol (1.7, 1.8) (0.001 mol) and substituted benzoic acid (0.0015 mol) in phosphorus oxychloride (15 ml) was refluxed for 5 hour. Then the mixture was slowly poured into crushed ice and neutralized with sodium hydrogen carbonate. The precipitate formed is removed by filtration and washed three times with cold water. The products were recrystallized from absolute ethanol and dried to obtain 3,6-disubstituted-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazoles (1.9–1.20).

Molecular Docking

It is known that 1,2,4-triazole derivatives exhibit pronounced inhibitory activity against a large number of enzymes [24, 25, 26, 27]. Among these enzymes are aromatase, cholinesterase, carbonic anhydrase, xanthine reductase, methionine aminopetidase-2, lipase, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, adenosine deaminase, thymidine phosphorylase and lipoxigenase. A well-known fact is the ability of a 1,2,4-triazole fragment to take part in the formation of intermolecular hydrogen bonds with the active center of various enzymes. The presence of other heterocyclic pharmacophores will only increase the number of such interactions. For example, pyrrole and indole.

A permanent strategy for the search for anti-inflammatory agents is to obtain new substances that can suppress cyclooxygenase, a key enzyme of the inflammation process. According to the literature, the study of the anti-inflammatory activity of various derivatives of 1,2,4-triazole and indole

demonstrates good results [26]. The results of virtual research are often confirmed by *in vivo* methods. The choice in favor of cyclooxygenase-1 against the background of the more relevant cyclooxygenase-2 is due to the possibility of assessing not only the likelihood of anti-inflammatory activity, but also the possibility of assessing the likelihood of a negative effect on a number of physiological processes (for example, protection of the gastrointestinal mucosa). The enzyme 14 α -demethylase controls the conversion of lanosterol into 4,14-dimethyl ergosterol at one of the stages of ergosterol biosynthesis (provides a barrier function and the work of enzymes associated with the membrane). This enzyme is a known target of azoles, which form complex hydrophobic interactions using side groups of nitrogen-containing rings and conserved residues of the active site of 14 α -demethylase, and also form a coordination binding of the Nitrogen atom of theazole synthon with the Iron atom of the heme group of this enzyme. These interactions lead to inactivation of 14 α -demethylase. The choice of anaplastic lymphoma kinase as a model target was also dictated by a number of reasons. Firstly, derivatives of 1,2,4-triazole can act as active ligands and form a coordination interaction with the active center of the enzyme. Secondly, dovitinib is used as a tyrosine kinase inhibitor; its structure contains an indole fragment covalently linked to other nitrogen-containing heterocycles. Considering the role of cyclooxygenase-1, lanosterol 14 α -demethylase and anaplastic lymphoma kinase as important pharmacological targets, and their inhibitors as the basis for the development of a number of drugs, the synthesized substances were analyzed using molecular docking.

Molecular docking was performed to obtain structural information on the interaction of the synthesized compounds and the corresponding biological structure. For this purpose, the X-ray crystal structures of the corresponding biological targets from the protein database (PDB-ID) in complex with the standard ligand were previously downloaded: cyclooxygenase-1 with diclofenac (3N8Y), lanosterol 14 α -demethylase with ketoconazole (3LD6), kinases of anaplastic lymphoma in the complex of crizotinib (2XP2) [28, 29, 30]. The ligands (diclofenac, ketoconazole, crizotinib) were previously removed from the primary structures. It was carried out the joining of different ligands to the protein using AUTODOCK. The conformations of the ligand were analyzed in terms of energy, hydrogen bonding and hydrophobic interaction between the ligand and the receptor protein. A detailed analysis of the ligand-receptor interactions was performed and the final coordinates of the ligand and receptor were saved as pdb files. The free binding energy (FEB) of all compounds was calculated.

RESULT AND DISCUSSION

The synthetic route for preparation of the newly synthesized compounds has been described in Figure 1. 4-Amino-5-(pyrrole-2-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol and 4-amino-5-(indole-3-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol were condensed with benzoic acid, 2-, 3-methoxybenzoic acid, 2-bromo-5-methoxybenzoic acid,

2-bromo-4-fluorophenylbenzoic acid and 2-chloro-5-nitrophenylbenzoic acid in POCl₃, the corresponding [1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazoles are formed.

*6-Phenyl-3-(pyrrole-2-yl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole (1.9)*. Yield: 82 %; brown crystals; m. p.: 212 – 214 °C; ¹H NMR (400 MHz, dimethyl sulfoxide d₆, ppm): 8.63 (d, 1H, pyrrole, NH), 8.09 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, pyrrole), 7.96 – 7.88 (m, 2H, ArH), 7.61 – 7.53 (m, 3H, ArH), 7.22 (dd, *J* = 6.6, 3.7 Hz, 1H, pyrrole), 7.06 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, pyrrole). Anal. calcd. (%) for C₁₃H₉N₅S: C, 58.41; H, 3.39; N, 26.20; S, 11.99. Found: C, 58.27; H, 3.40; N, 26.14; S, 12.02.

*6-(2-Methoxyphenyl)-3-(pyrrole-2-yl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole (1.10)*. Yield: 71 %; brown crystals; m. p.: 205 – 207 °C; ¹H NMR (400 MHz, dimethyl sulfoxide d₆, ppm): 8.58 (d, 1H, pyrrole, NH), 8.14 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, pyrrole), 8.02 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, ArH), 7.49-7.45 (m, 1H, ArH), 7.27 (dd, *J* = 6.7, 3.6 Hz, 1H, pyrrole), 7.19 – 7.12 (m, 2H, ArH), 7.05 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, pyrrole), 4.04 (s, 3H, Ar-OCH₃). Anal. calcd. (%) for C₁₄H₁₁N₅OS: C, 56.55; H, 3.73; N, 23.55; S, 10.78. Found: C, 56.70; H, 3.72; N, 23.61; S, 10.75.

*6-(3-Methoxyphenyl)-3-(pyrrole-2-yl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole (1.11)*. Yield: 75 %; brown crystals; m. p.: 209 – 211 °C; ¹H NMR (400 MHz, dimethyl sulfoxide d₆, ppm): 8.62 (d, 1H, pyrrole, NH), 8.08 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, pyrrole), 7.63 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, ArH), 7.51 – 7.46 (m, 2H, ArH), 7.27 (dd, *J* = 6.7, 3.6 Hz, 1H, pyrrole), 7.11 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, ArH), 7.04 (dd, *J* = 8.6, 3.6 Hz, 1H, pyrrole), 3.86 (s, 3H, Ar-OCH₃). Anal. calcd. (%) for C₁₄H₁₁N₅OS: C, 56.55; H, 3.73; N, 23.55; S, 10.78. Found: C, 56.39; H, 3.72; N, 23.62; S, 10.81.

*6-(2-Bromo-5-methoxyphenyl)-3-(pyrrole-2-yl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole (1.12)*. Yield: 68 %; brown crystals; m. p.: 203 – 205 °C; ¹H NMR (400 MHz, dimethyl sulfoxide d₆, ppm): 8.59 (d, 1H, pyrrole, NH), 8.14 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, pyrrole), 7.65 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, ArH), 7.25 (dd, *J* = 6.7, 3.6 Hz, 1H, pyrrole), 7.06 (dd, *J* = 8.6, 3.6 Hz, 1H, pyrrole), 6.88 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, ArH), 3.82 (s, 3H, Ar-OCH₃). Anal. calcd. (%) for C₁₄H₁₀BrN₅OS: C, 44.69; H, 2.68; N, 18.61; S, 8.52. Found: C, 44.79; H, 2.69; N, 18.57; S, 8.50

*6-(2-Bromo-4-fluorophenyl)-3-(pyrrole-2-yl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole (1.13)*. Yield: 77 %; brown crystals; m. p.: 217 – 219 °C; ¹H NMR (400 MHz, dimethyl sulfoxide d₆, ppm): 8.62 (d, 1H, pyrrole, NH), 8.09 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, pyrrole), 7.68 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.41 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, ArH), 7.23 (dd, *J* = 6.6, 3.7 Hz, 2H, pyrrole), 7.17 (dd, *J* = 7.8, 2.8 Hz, 1H, ArH), 7.05 (dd, *J* = 8.6, 3.6 Hz, 1H, pyrrole). Anal. calcd. (%) for C₁₃H₇BrFN₅S: C, 42.87; H, 1.94; N, 19.23; S, 8.80. Found: C, 42.70; H, 1.95; N, 19.28; S, 8.78

*6-(2-Chloro-5-nitrophenyl)-3-(pyrrole-2-yl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole (1.14)*. Yield: 82 %; brown crystals; m. p.: 224 – 226 °C; ¹H NMR (400 MHz, dimethyl sulfoxide d₆, ppm): 8.63

(d, 1H, pyrrole, NH), 8.49 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, ArH), 8.26 (dd, $J = 8.6, 2.2$ Hz, 1H, ArH), 8.14 (d, $J = 6.7, 1$ Hz, pyrrole), 7.88 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, ArH), 7.25 (dd, $J = 6.7, 3.6$ Hz, 2H, pyrrole), 7.06 (dd, $J = 8.4, 3.6$ Hz, 1H, pyrrole). Anal. calcd. (%) for $C_{13}H_7ClN_6O_2S$: C, 45.03; H, 2.03; N, 24.24; S, 9.25. Found: C, 44.91; H, 2.02; N, 24.30; S, 9.27.

3-(Indole-3-yl)-6-phenyl-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole (1.15). Yield: 81 %; yellow crystals; m. p.: 233 – 235 °C; 1H NMR (400 MHz, dimethyl sulfoxide d_6 , ppm): 11.65 (s, 1H, NH indole), 8.26 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, Indole-H), 8.03 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, Indole-H), 7.96 – 7.89 (m, 2H, ArH), 7.58 – 7.46 (m, 3H, ArH), 7.38 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, Indole-H), 7.25 (t, $J = 7.3, 6.9$ Hz, 1H, Indole-H), 7.19 (t, $J = 7.8, 7.4$ Hz, 1H, Indole-H). Anal. calcd. (%) for $C_{17}H_{11}N_5S$: C, 64.34; H, 3.49; N, 22.07; S, 10.10. Found: C, 64.16; H, 3.50; N, 22.01; S, 10.13

3-(Indole-3-yl)-6-(2-methoxyphenyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole (1.16). Yield: 67 %; brown crystals; m. p.: 222 – 224 °C; 1H NMR (400 MHz, dimethyl sulfoxide d_6 , ppm): 11.66 (s, 1H, NH indole), 8.29 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, Indole-H), 8.05 – 7.99 (m, 2H, ArH, Indole-H), 7.51 – 7.46 (m, 1H, ArH), 7.39 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Indole-H), 7.25 (t, $J = 7.3, 6.9$ Hz, 1H, Indole-H), 7.18 – 7.13 (m, 3H, ArH, Indole-H), 4.09 (s, 3H, Ar-OCH₃). Anal. calcd. (%) for $C_{18}H_{13}N_5OS$: C, 62.23; H, 3.77; N, 20.16; S, 9.23. Found: C, 62.07; H, 3.76; N, 20.21; S, 9.25

3-(Indole-3-yl)-6-(3-methoxyphenyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole (1.17). Yield: 72 %; brown crystals; m. p.: 235 – 237 °C; 1H NMR (400 MHz, dimethyl sulfoxide d_6 , ppm): 11.66 (s, 1H, NH indole), 8.29 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, Indole-H), 8.01 (d, 1H $J = 8.6$ Hz, 1H, Indole-H), 7.57 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, ArH), 7.49 – 7.43 (m, 2H, ArH), 7.38 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Indole-H), 7.25 (t, $J = 7.3, 6.9$ Hz, 1H, Indole-H), 7.16 (t, $J = 7.2, 7.7$ Hz, 1H, Indole-H), 7.10 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, ArH), 3.93 (s, 3H, Ar-OCH₃). Anal. calcd. (%) for $C_{18}H_{13}N_5OS$: C, 62.23; H, 3.77; N, 20.16; S, 9.23. Found: C, 62.39; H, 3.78; N, 20.11; S, 9.21

6-(2-Bromo-5-methoxyphenyl)-3-(indole-3-yl)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole (1.18). Yield: 77 %; brown crystals; m. p.: 241 – 243 °C; 1H NMR (400 MHz, dimethyl sulfoxide d_6 , ppm): 11.63 (s, 1H, NH indole), 8.31 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, Indole-H), 7.94 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, Indole-H), 7.70 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, ArH), 7.41 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, Indole-H), 7.33 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, ArH), 7.25 (t, $J = 7.3, 6.8$ Hz, 1H, Indole-H), 7.17 (t, $J = 7.2, 7.6$ Hz, 1H Indole-H), 6.83 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, ArH), 3.87 (s, 3H, Ar-OCH₃). Anal. calcd. (%) for $C_{18}H_{12}BrN_5OS$: C, 50.72; H, 2.84; N, 16.43; S, 7.52. Found: C, 50.84; H, 2.83; N, 16.47; S, 7.50.

6-(2-Bromo-4-fluorophenyl)-3-(indole-3-yl)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole (1.19). Yield: 72 %; brown crystals; m. p.: 229 – 231 °C; 1H NMR (400 MHz, dimethyl sulfoxide d_6 , ppm): 11.60 (s, 1H, NH indole), 8.30 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, Indole-H), 7.93 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, Indole-H), 7.69 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.46 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, ArH), 7.40 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, Indole-H), 7.23 (t, $J =$

7.3, 6.8 Hz, 1H, Indole-H), 7.19 – 7.13 (m, 2H, ArH, Indole-H). Anal. calcd. (%) for C₁₇H₉BrFN₅S: C, 49.29; H, 2.19; N, 16.91; S, 7.74. Found: C, 49.42; H, 2.18; N, 16.96; S, 7.72

6-(2-Chloro-5-nitrophenyl)-3-(indole-3-yl)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole (1.20). Yield: 69 %; brown crystals; m. p.: 247 – 249 °C; ¹H NMR (400 MHz, dimethyl sulfoxide d₆, ppm): 11.61 (s, 1H, NH indole), 8.48 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, ArH), 8.35 – 8.27 (m, 2H, ArH, Indole-H), 7.94 (d, *J* = 7.2, Hz, 1H, Indole-H), 7.87 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.40 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Indole-H), 7.25 (t, *J* = 7.3, 6.8 Hz, 1H, Indole-H), 7.16 (t, *J* = 7.8, 7.4 Hz, 1H, Indole-H). Anal. calcd. (%) for C₁₇H₉ClN₆O₂S: C, 51.46; H, 2.29; N, 21.18; S, 8.08. Found: C, 51.34; H, 2.28; N, 21.23; S, 8.10.

The product structures (1.9-1.20) were confirmed by elemental analysis and ¹H NMR spectra that showed expected signals. The signals of the protons of the pyrrole fragment form doublet (positions 3 and 5) and also form doublet of doublets (position 4). The signal from the NH-group of pyrrole forms a pronounced singlet at 8.63-8.55 ppm.

In the ¹H NMR spectra of the indole fragment the protons at the 4 and 7 position appear as doublets and at the 5 and 6 position as triplets. Also in the spectra of the synthesized compounds 1.15-1.20, extended signals of protons of the NH-acid center in the form of a singlet in the low magnetic field are observed. Proton signal at the 2 position of the indole synthon appear as doublets. The presence of aryl fragments determines the formation of a number of multiplets in the "aromatic" region. The appearance of electron-withdrawing substituents in the phenyl fragment leads to an insignificant shift of the signals of aromatic protons towards the weak field and simplification of their multiplicity.

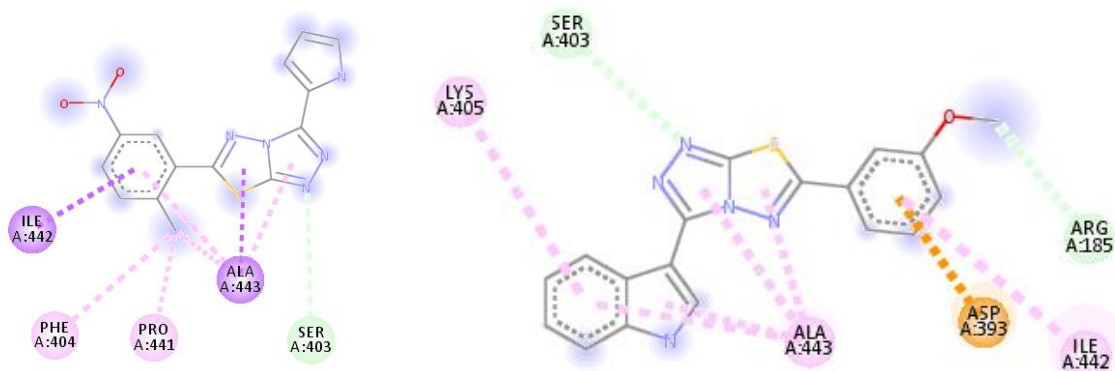
In order to investigate the probability of detection of molecules with molecules with anti-inflammatory activity, the interaction parameters with the active center of cyclooxygenase-1 (COX-1) were studied (Table 1). Visualization of the interaction of the most active compounds with the active center of COX-1 made it possible to establish the presence of hydrogen intermolecular chemical bonds with such amino acid residues as: ARG A: 185, SER A: 403.

It should also be noted the presence of π -alkylhydrophobic interactions with such amino acid residues as ALA A: 443, ILE A: 442, LYS A: 405, PHE A: 404, PRO A: 441 (Figure 2).

Table 1. Energy values of the intermolecular interactions of the studied compounds with COX-1 (3N8Y)

N	<i>E</i> _{min} , kcal/mol	N	<i>E</i> _{min} , kcal/mol	N	<i>E</i> _{min} , kcal/mol
1.5	-7.1	1.11	-5.7	1.16	-6.7
1.6	-5.6	1.12	-5.5	1.17	-5.9
1.9	-5.5	1.13	-5.6	1.18	-6.9
1.10	-5.5	1.14	-5.8	1.19	-6.4
<i>Diclofenac</i>	-10.4	1.15	-6.0	1.20	-6.9

**E*_{min} - The minimum energy of complex formation, kcal/mol.



Interactions

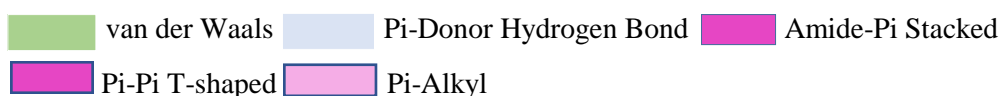


Figure 2. Visualization of the affinity of the COX-1 with compound 1.14 and 1.17

The free energy of binding of the synthesized substances of their lowest energy positions with lanosterol-14 α -demethylase was calculated (Table 2). Compounds 1.16-1.20 showed a good range of binding energies from – 10.1 to – 10.6 kcal/mol. Visualization of the interaction of active structures with the active site of lanosterol-14 α -demethylase revealed that they have chemical bonds with the following amino acid residues: ALA A: 311, CYS A: 449, GLY A: 307, HIS A: 314, ILE A: 377, ILE A: 379, ILE A: 450, LEU A: 159, LEU A: 308, MET A: 304, MET A: 487, TYR A: 145. In addition, you can note the interaction with LYS A 79, TYR A 131, PRO A 81, MET A 378, GLU A 83, PHE A 84, SER A 80 (Figure 3).

Table 2. Energy values of the intermolecular interactions of the studied compounds with lanosterol-14 α -demethylase (3LD6)

N	E_{min} , kcal/mol	N	E_{min} , kcal/mol	N	E_{min} , kcal/mol
1.5	-5.7	1.11	-8.6	1.16	-10.2
1.6	-7.5	1.12	-8.1	1.17	-10.5
1.9	-8.3	1.13	-8.5	1.18	-10.1
1.10	-8.5	1.14	-8.7	1.19	-10.2
Ketoconazole	-9.9	1.15	-9.6	1.20	-10.6

* E_{min} - The minimum energy of complex formation, kcal/mol.

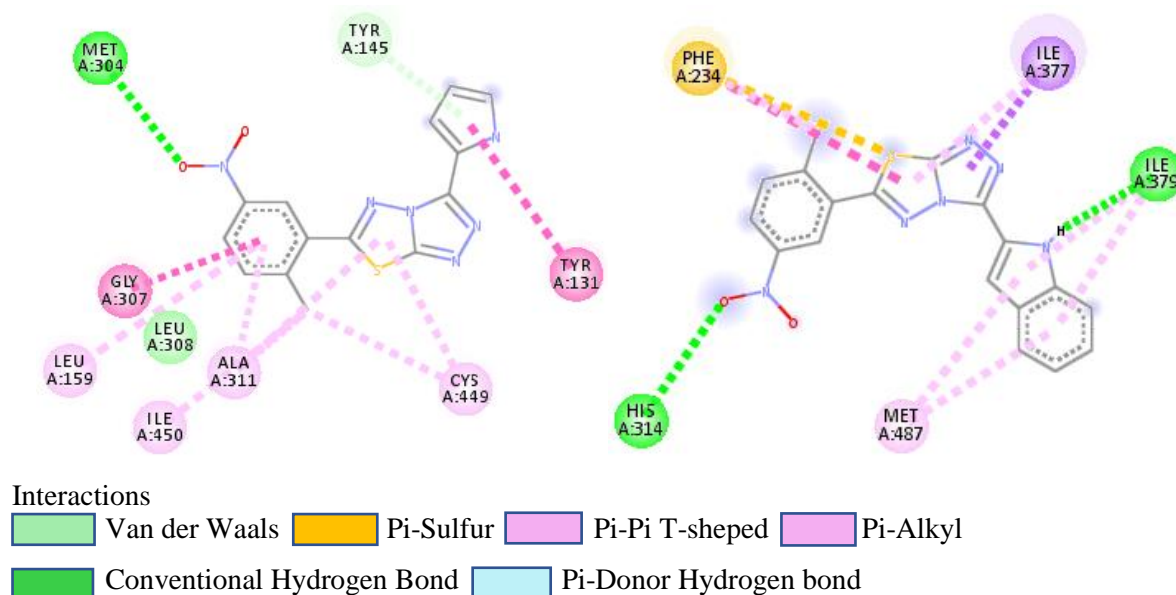


Figure 3. Visualization of the affinity of the lanosterol-14 α -demethylase with compound 1.14 and 1.20

The free binding energy calculations performed demonstrate that most of synthesized compounds have good binding affinity for the anaplastic lymphoma kinase (Table 3). Among synthesized compounds, substances 1.14 and 1.20 bind the most strongly at the target site 3LD6. In addition, for these compounds, the free energy of binding was established, which was -8.3 kcal/mol and -9.5 kcal/mol, respectively (Table 3).

Various amino acids residues are involved in this process: ALA A: 1148, LEU A: 1122, LEU A: 1256, MET A: 1199, VAL A: 1130 (1.14, 1.20) and LYS A: 1150 (1.20) (Figure 4).

Table 3. Energy values of the intermolecular interactions of the studied compounds with anaplastic lymphoma kinase (2XP2)

N	* E_{min} , kcal/mol	N	* E_{min} , kcal/mol	N	* E_{min} , kcal/mol
1.5	-5.4	1.11	-8.2	1.16	-9.0
1.6	-7.2	1.12	-7.5	1.17	-9.0
1.9	-7.7	1.13	-7.3	1.18	-8.6
1.10	-8.1	1.14	-8.3	1.19	-8.9
Crizotinib	-10.2	1.15	-8.5	1.20	-9.5

* E_{min} - The minimum energy of complex formation, kcal/mol.

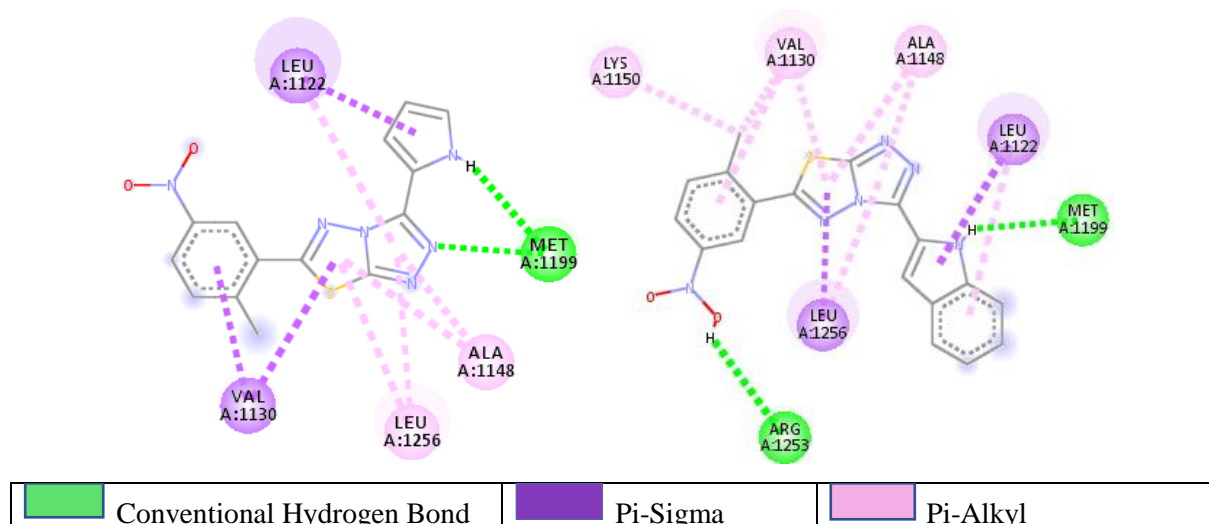


Figure 4. Visualization of the affinity of the anaplastic lymphoma kinase with compound 1.14 and 1.20

In docking analysis, the interaction of active structures with the active site of anaplastic lymphoma kinase π - π -interaction and hydrogen bond were observed in the potent ligand docking complex. Moreover, triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole fragment formed the number π -interactions such as π -alkyl and π - σ interactions with ALA A: 1148, LEU A: 1256, VAL A: 1130 (Figure 4). The anaplastic lymphoma kinase affinity of compounds 1.14 and 1.20 was also associated with the presence of hydrogen bonds with the corresponding amino acid residues (MET A: 1199).

A series of novel [1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazoles have been successfully synthesized. The structure and individuality of the synthesized compounds were confirmed by ^1H NMR, and LC-MS spectra, elemental analysis. Molecular docking studies have shown the ability of the synthesized compounds to integrate into the active centers of enzymes. According to docking results, compounds 1.14 and 1.20 are of interest for further research. These compounds showed good binding energy to specific proteins (COX-1, lanosterol-14 α -demethylase, anaplastic lymphoma kinase).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank A. Voskoboynik (ZSMU, Zaporizhzhia, Ukraine) considerable support during the preparation this article.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception: A. G., Y. Z., T. B.; Design: A. G., Y. Z.; Supervision: A. G., Y. Z.; Resources: A. G., Y. Z., T. B.; Materials: A. G., Y. Z.; Data collection and/or processing: A. G., Y. Z., T. B.; Analysis and/or

interpretation: A. G.; Literature search: A. G.; Writing manuscript: A. G., Y. Z., T. B.; Critical review: A. G., Y. Z.; 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. Zaher, N.H., Mostafa, M.I., Altaher, A.Y. (2020). Design, synthesis and molecular docking of novel triazole derivatives as potential CoV helicase inhibitors. *Acta Pharmaceutica*, 70(2), 145-159. [\[CrossRef\]](#)
2. Özil, M., Tacal, G., Baltaş, N., Emirik, M. (2020). Synthesis and molecular docking studies of novel triazole derivatives as antioxidant agents. *Letters in Organic Chemistry*, 17(4), 309-320. [\[CrossRef\]](#)
3. Vanjare, B.D., Mahajan, P.G., Dige, N.C., Raza, H., Hassan, M., Han, Y., Lee, K.H. (2021). Novel 1,2,4-triazole analogues as mushroom tyrosinase inhibitors: Synthesis, kinetic mechanism, cytotoxicity and computational studies. *Molecular Diversity*, 25, 2089–2106. [\[CrossRef\]](#)
4. Aggarwal, R., Sumran, G. (2020). An insight on medicinal attributes of 1,2,4-triazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 205, 112652. [\[CrossRef\]](#)
5. Sonawane, A.D., Rode, N.D., Nawale, L., Joshi, R.R., Joshi, R.A., Likhite, A.P., Sarkar, D. (2017). Synthesis and biological evaluation of 1,2,4-triazole-3-thione and 1,3,4-oxadiazole-2-thione as antimycobacterial agents. *Chemical Biology & Drug Design*, 90(2), 200-209. [\[CrossRef\]](#)
6. Olesiejuk, M., Kudelko, A., Swiatkowski, M., Kruszynski, R. (2019). Synthesis of 4-alkyl-4H-1,2,4-triazole derivatives by Suzuki cross-coupling reactions and their luminescence properties. *Molecules*, 24(3), 652. [\[CrossRef\]](#)
7. Riaz, N., Iftikhar, M., Saleem, M., Aziz-ur-Rehman Hussain, S., Rehmat, F., al-Rashida, M. (2020). New synthetic 1,2,4-triazole derivatives: Cholinesterase inhibition and molecular docking studies. *Results in Chemistry*, 2, 100041. [\[CrossRef\]](#)
8. Simurova, N.V., Maiboroda, O.I. (2021) Antiviral activity of 1,2,4-triazole derivatives (microreview). *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 57, 420-422. [\[CrossRef\]](#)
9. El-Reedy, A.A.M., Soliman, N.K. (2020). Synthesis, biological activity and molecular modeling study of novel 1,2,4-triazolo[4,3-b][1,2,4,5]tetrazines and 1,2,4-triazolo[4,3-b][1,2,4]triazines. *Scientific Reports*, 10, 6137. [\[CrossRef\]](#)

10. Gorgu, O., Yıldırım, E., Ozkan, Y., Cakır, B., Erol, K., Onkol, T. (2020). Microwave-assisted synthesis and pharmacological screening of some triazolothiadiazole derivatives. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56, e18111. [[CrossRef](#)]
11. El Bakri, Y., Marmouzi, I., El Jemli, M., Anouar, E.H., Karthikeyan, S., Harmaoui, A., Fauzi, M.E.A., Mague, J.T., Essassi, E.M. (2019). Synthesis, biological activity and molecular modeling of a new series of condensed 1,2,4-triazoles. *Bioorganic Chemistry*, 92, 1031932019. [[CrossRef](#)]
12. Holota, S., Komykhov, S., Sysak, S., Gzella, A., Cherkas, A., Lesyk, R. (2021). Synthesis, characterization and *in vitro* evaluation of novel 5-ene-thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazole-6(5*H*)-ones as possible anticancer agents. *Molecules*, 26, 11622021. [[CrossRef](#)]
13. Singla, N. (2020). Synthetic and medicinal attributes of 1,2,4-triazole derivatives. *Annals of Tropical Medicine & Public Health*, 23(14), SP231541. [[CrossRef](#)]
14. Boraie, A.T.A., Sarhan, A.A.M., Yousuf, S., Barakat, A. (2020). Synthesis of a new series of nitrogen/sulfur heterocycles by linking four rings: Indole; 1,2,4-triazole; pyridazine; and Quinoxaline. *Molecules*, 25(3), 450. [[CrossRef](#)]
15. Mioc, M., Avram, S., Bercean, V., Kurunczi, L., Ghiulai, R.M., Oprean, C., Soica, C. (2018). Design, synthesis and biological activity evaluation of *S*-substituted 1*H*-5-mercapto-1,2,4-triazole derivatives as antiproliferative agents in colorectal cancer. *Frontiers in Chemistry*, 6, 373. [[CrossRef](#)]
16. Hotsulia, A.S., Fedotov, S.O. (2020). Synthesis and properties of 5-(((5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-yl)thio)methyl)-4-phenyl-1,2,4-triazole-3-thione and its some *S*-derivatives. *Current Issues in Pharmacy and Medicine: Science and Practice*, 13(2), 182-186. [[CrossRef](#)]
17. Karpun, Ye.O., Karpenko, Yu.V., Parchenko, M.V., Bihdan, O.A. (2020). Molecular docking and bioavailability of *S*-alkyl derivatives 5-(3-fluorophenyl)-, 5-(5-bromofuran-2-yl)- and -(((3-(pyridin-4-yl)-1*H*-1,2,4-triazole-5-yl)thio)methyl)-4-methyl-4*H*-1,2,4-triazole *in silico* methods. *Current Issues in Pharmacy and Medicine: Science and Practice*, 13(1), 38-45. [[CrossRef](#)]
18. Funt, L.D., Tomashenko, O.A., Khlebnikov, A.F., Novikov, M.S., Ivanov, A.Y. (2016). Synthesis, transformations of pyrrole and 1,2,4-triazole-containing ensembles, and generation of pyrrole-substituted triazole NHC. *The Journal of Organic Chemistry*, 81(22), 11210–11221. [[CrossRef](#)]
19. Roman, G. (2019). Schiff bases and triazolothiadiazines derived from a thiophene-substituted 4-amino-3-mercapto-1,2,4-triazole. *Acta Chemica Iasi*, 27(2), 137-154. [[CrossRef](#)]
20. Ghanaat, J., Khalilzadeh, M.A., Zareyee, D. (2020). Molecular docking studies, biological evaluation and synthesis of novel 3-mercapto-1,2,4-triazole derivatives. *Molecular Diversity*, 25(1), 223-232. [[CrossRef](#)]
21. Mohammed, H.H.H., Abdelhafez, E.-S.M.N., Abbas, S.H., Moustafa, G.A.I., Hauk, G., Berger, J.M., Abuo-Rahma, G.E.-D.A. (2019). Design, synthesis and molecular docking of new *N*-4-piperazinyl ciprofloxacin-triazole hybrids with potential antimicrobial activity. *Bioorganic Chemistry*, 88, 102952. [[CrossRef](#)]
22. Hotsulia, A.S., Fedotov, S.O. (2019). Synthesis, structure and properties of *N*-R-2-(5-(5-methyl-1*H*-pyrazole-3-yl)-4-phenyl-4*H*-1,2,4-triazole-3-ylthio) acetamides. *Current Issues in Pharmacy and Medicine: Science and Practice*, 12(1), 4-9. [[CrossRef](#)]

23. Kumar, S., Ritika. (2020). A brief review of the biological potential of indole derivatives. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6, 121. [CrossRef]
24. Mojaddami, A., Sakhteman, A., Fereidoonzhad, M., Faghih, Z., Najdian, A., Khabnadideh, S., Sadeghpour, H., Rezaei, Z. (2017). Binding mode of triazole derivatives as aromatase inhibitors based on docking, protein ligand interaction fingerprinting, and molecular dynamics simulation studies. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 12(1), 21-30. [CrossRef]
25. Andrianov, A.M., Nikolaev, G.I., Kornoushenko, Y.V., Usanov, S.A. (2019). Click chemistry *in silico*, docking, quantum chemical calculations and molecular dynamics simulations to identify novel 1,2,4-triazole-based compounds as potential aromatase inhibitors. *SN Applied Sciences*, 1, 1026. [CrossRef]
26. Pathak, P., Shukla, P.K., Naumovich, V., Grishina, M., Verma, A., Potemkin, V. (2020). 1,2,4-triazole-conjugated 1,3,4-thiadiazole hybrid scaffolds: A potent ameliorant of carrageenan-induced inflammation by lessening proinflammatory mediators. *Archiv der Pharmazie*, 353, e1900233. [CrossRef]
27. Eliwi, A.G., Ali, Z.Z.M., Al-Saady, F.A., Abdulsada, S.H., Atia, A.J.K. (2020). Synthesis and acetyl cholinesterase inhibitory activity of new oxazole, 1,2,4-triazole derivatives bearing carbamazepine as nucleus. *AIP Conference Proceedings*, 2213, 020301. [CrossRef]
28. Protein Data Bank, pdb. Retrieved from <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>. Accessed date 15.07.2021.
29. MarvinSketch version 17.21.0, ChemAxon. Retrieved from <http://www.chemaxon.com.2>. Accessed date 15.07.2021.
30. Trott, O., Olson, A.J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31, 455-461. [CrossRef]
31. Гоцуля, А.С., Вербa, Д.П., Панасенко, О.І., Книш, Є.Г. (2017). Синтез та дослідження властивостей похідних 4-феніл-5-(1*H*-пірол-2-іл)-4*H*-1,2,4-триазол-3-тіолів. *Фармацевтичний журнал*, 1, 59-66. [CrossRef]



INTERACTION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* WITH SOLID LIPID NANOPARTICLES

STAPHYLOCOCCUS AUREUS'UN KATI LİPİD NANOPARTİKÜLLER İLE ETKİLEŞİMİ

Merve Eylul KIYMACI* 

¹University of Health Sciences Turkey, Gülhane Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, 06018, Ankara, Turkey

ABSTRACT

Objective: *The ability of bacteria to develop resistance to existing antibiotics has made the search for new antimicrobials or antimicrobial formulations a matter of urgency. Among drug delivery systems, solid lipid nanoparticles are considered solution-oriented systems with advantages for targeted drug delivery.*

Material and Method: *In this study, the bacterial uptake of SLNs encapsulated with fluorescein into Staphylococcus aureus ATCC 29213 was investigated by a flow cytometry method to be a preliminary study for antibiotic improvement studies.*

Result and Discussion: *It was determined that ~60% of fluorescein-SLNs were taken into S. aureus ATCC 29213 cells within 1h. The results were found to be promising for future studies with antibiotics.*

Keywords: *Bacterial uptake, flow cytometry, Staphylococcus aureus, solid lipid nanoparticle*

ÖZ

Amaç: *Bakterilerin mevcut antibiyotiklere direnç geliştirme yeteneği, yeni antimikrobiklerin ya da antimikrobiyal formülasyonların araştırılmasının aciliyetini ortaya koymaktadır. İlaç taşıyıcı sistemler arasında, katı lipid nanopartiküller, hedeflenen ilaç uygulaması için avantajlara sahip, çözüm odaklı sistemler olarak kabul edilir.*

Gereç ve Yöntem: *Bu çalışmada, antibiyotik iyileştirme çalışmaları için bir ön çalışma olması amacıyla floresein yüklenmiş SLN'lerin Staphylococcus aureus ATCC 29213'e bakteri alımı akış sitometrisi yöntemiyle araştırıldı.*

Sonuç ve Tartışma: *Floresein-SLN'lerin ~%60'ının 1 saat içinde S. aureus ATCC 29213 hücrelerine alındığı belirlendi. Sonuçların gelecekte antibiyotiklerle yapılacak çalışmalar için umut verici olduğu bulundu.*

Anahtar Kelimeler: *Akış sitometresi, bakteriyel alım, katı lipid nanopartikül, Staphylococcus aureus*

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Merve Eylul Kiymaci
e-mail / e-posta: mekiymaci@gmail.com, **Phone / Tel.:** 0312 3046073

INTRODUCTION

Antibiotic resistance is one of the global public health problems. The unconscious use of antibiotics causes the emergence of resistant bacteria and the spread of resistance among individuals. In addition, undesirable situations arise such as the fact that existing drugs are effective at higher doses, lose their effectiveness, and bacteria develop resistance to more than one different group of antibiotics [1, 2]. The failure of the strongest antibiotics to be effective against resistant strains highlights the urgency of the need to develop other alternative control agents. In order to maintain the treatment and prevent the formation of resistance, studies on developing new alternative drugs have gained importance. These alternative approaches include the development of active substances from plant sources [3], chemical modifications [4], inhibition of bacterial communication systems [5], use of phages [6], antimicrobial peptides, and nano-drug development technologies [7].

Nano-drug development technologies include nanoparticles which are carrier systems consisting of natural or synthetic polymers in nm sizes (10-1000 nm). In these systems, the drug can be dissolved or encapsulated [8, 9]. Solid lipid nanoparticles (SLNs) are colloidal carrier systems developed as an alternative to existing conventional carriers such as polymeric nanoparticles, liposomes, and nanoemulsions. SLNs are new generation nano-sized lipid emulsions in which a liquid lipid is replaced with a solid lipid and since the particles are completely metabolized by the body, it is considered quite safe for administration. In addition to their large surface area, tolerability, stability, scaling-up feasibility, these nanoparticles improve the performance of pharmaceuticals with their high drug loading capacity and phase interactions [10].

One of the main obstacles to the elimination of target bacteria in the host during treatment is considered to be the low uptake of antibiotics into infected cells. This situation is also related to the intracellular resistance of the bacteria and creates the need for studies to increase the uptake of antibiotics into the cell [11, 12].

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is a Gram-positive bacterium that is one of the major human pathogens. *S. aureus* causes a wide range of infections like bacteremia, infective endocarditis, device-related, skin and soft tissue, pleuropulmonary infections [13]. It has also many virulence factors associated with these infections; enzymes such as hemolysin, leukocidin, protease; enterotoxins, exfoliative toxins, etc. toxins, and immune-modulatory factors [14]. *S. aureus* is among the bacteria known for its ability to develop resistance to antibiotics. Infections initiated by antibiotic-resistant strains can generate epidemic waves [15].

To provide a solution to the different problems listed above and to improve the therapeutic potential of drugs, this study aimed to investigate the bacterial uptake of SLNs encapsulated with fluorescein in *S. aureus* ATCC 29213. SLNs were prepared and characterized in terms of size,

polydispersity index (PI), and zeta potential. Moreover, comprehensive microscopy and flow cytometry studies showed the bacterial uptake of SLNs.

MATERIAL AND METHOD

Materials and reagents

Fluorescein and Pluronic F127 was purchased from Sigma-Aldrich (USA). Compritol ATO 888 was gifted from GATTEFOSE (France). In addition, bacterial media were purchased from Merck Life Science (Germany). Tryptic soy agar (agar; 15 g/L, casein peptone (pancreatic); 15 g/L, sodium chloride; 5 g/L, soya peptone; 5 g/L), and tryptic soy broth (casein peptone; 17 g/L, dipotassium hydrogen phosphate; 2.5 g/L, glucose; 2.5 g/L, sodium chloride; 5 g/L, soya peptone; 3 g/L) were used in bacterial production. All other chemicals and reagents used in the study but not included in the text were used as an analytical grade.

Preparation of solid lipid nanoparticles

Hot homogenization and ultrasonication methods were used to prepare the nanoparticles. Compritol ATO 888 (150 mg) and Pluronic F127 (100 mg) were added in a wide-mouth glass container as lipid phase and heated to 70°C by a heating mantle (IKA, Germany). 5 mg fluorescein was dissolved in ultrapure water and heated to 70°C. The oil phase was poured into the fluorescein solution under magnetic stirring at 300 rpm for 1 minute to form an oil in water emulsion, and then further probe sonicated for 1 minute (Bandelin Sonoplus, Germany), with an amplitude of 50 % to form a nanoemulsion. The nanoparticles were purified by dialysis (12-14 kDa) against ultrapure water for 24 h at 3 times. The SLNs were lyophilized (Christ Gama 2-20, USA). The control SLN was prepared with a similar method without adding fluorescein.

Determination of the size of the particle, polydispersity index, and zeta potential

The photon correlation spectroscopy (PCS) using Zetasizer Nicomp Z3000 at 25°C was used to measure the size of the particle, PI, and zeta potential of fluorescein loaded SLNs. To remove the bubbles and disperse aggregates the samples were ultrasonicated for 5 seconds at 0°C to suspend in distilled water. For particle size and PI, the concentration of samples was 2.7 mg/mL. To achieve the optimal kilo counts per second of 20 to 400 for measurements, the sample concentration was 0.3 mg/mL for zeta potential determinations.

Bacterial strain

S. aureus ATCC 29213 was tested as a bacterial strain. Tryptic soy agar and broth medium were used for bacterial production and the study was carried out with a 24-hour fresh bacterial culture.

Bacterial uptake of nanoparticles

To exhibit the bacterial uptake of SLNs, fluorescent microscopy examination and flow cytometry analysis were carried out. At the exponential phase of *S. aureus* ATCC 29213, the calculated amount of SLNs was added to 0.1 mL bacterial suspension and incubated for 1 and 4 hours at 37°C. After 1 and 4 h incubation, the bacterial pellet and culture supernatant was separated by centrifugation at 8000 rpm. The pellet of *S. aureus* ATCC 29213 was washed with sterile distilled water 3 times to dispose of free SLNs. Then the pellet was suspended in 1 mL of sterile distilled water. The CYTOFlex cytometer (Beckman Coulter, USA) was used to observe the fluorescent intensity of *S. aureus* cells. Green fluorescence was collected through a 488 nm blocking filter, a 525/40 BP fluorescent channel. Thereabout ten thousand cells of each sample were analyzed. Data were evaluated and histograms were generated and interpreted using CytExpert Software. In addition, to detect the position of the fluorescein-SLNs in bacteria, the cells were observed under an inverted fluorescent microscope (Leica, Germany) at 40x magnification, and images were taken [8].

RESULT AND DISCUSSION

In this study, a flow cytometry method for the detection of bacterial uptake of nanoparticles has been investigated. The fact that nanoparticle uptake into bacteria can be evaluated over several generations constitutes the originality of this study. Flow cytometry provides rapid, multi-parameter analysis, reducing false-negative results, obtaining accurate statistical data, and has advantages compared to transmission electron microscopy.

Firstly, some characterization studies were performed for fluorescein-loaded SLNs. Particle size and distribution were found 183.6 ± 0.45 nm and 0.296 ± 0.01 respectively. The Zeta potential of SLNs was detected -8.33 mV. According to the results, we achieved to obtain small particles within a narrow particle range.

The correlation of the forward (FSC), and side scatter (SSC) intensity are well established [16, 17] with the cellular size, granularity of cells, and cellular mass. According to the differential forward, and side scatter properties, locating bacteria in the FSC-SSC dot plot is constituting the aim of the experiment.

In the control histogram of *S. aureus* ATCC 29213 cells (Figure 1a), there was no fluorescence detected. Otherwise, significant fluorescence was determined in the flow cytometry histogram (Figure 1b-1d) of *S. aureus* ATCC 29213 cells treated with fluorescein and fluorescein-loaded SLNs. Histograms further revealed that fluorescein-SLNs were more efficiently up taken (59.28% and 99.48% for 1h and 4h, Figure 1b, 1d) than fluorescein solution (18.02% and 25.23% for 1h and 4h, Figure 1c, 1e).

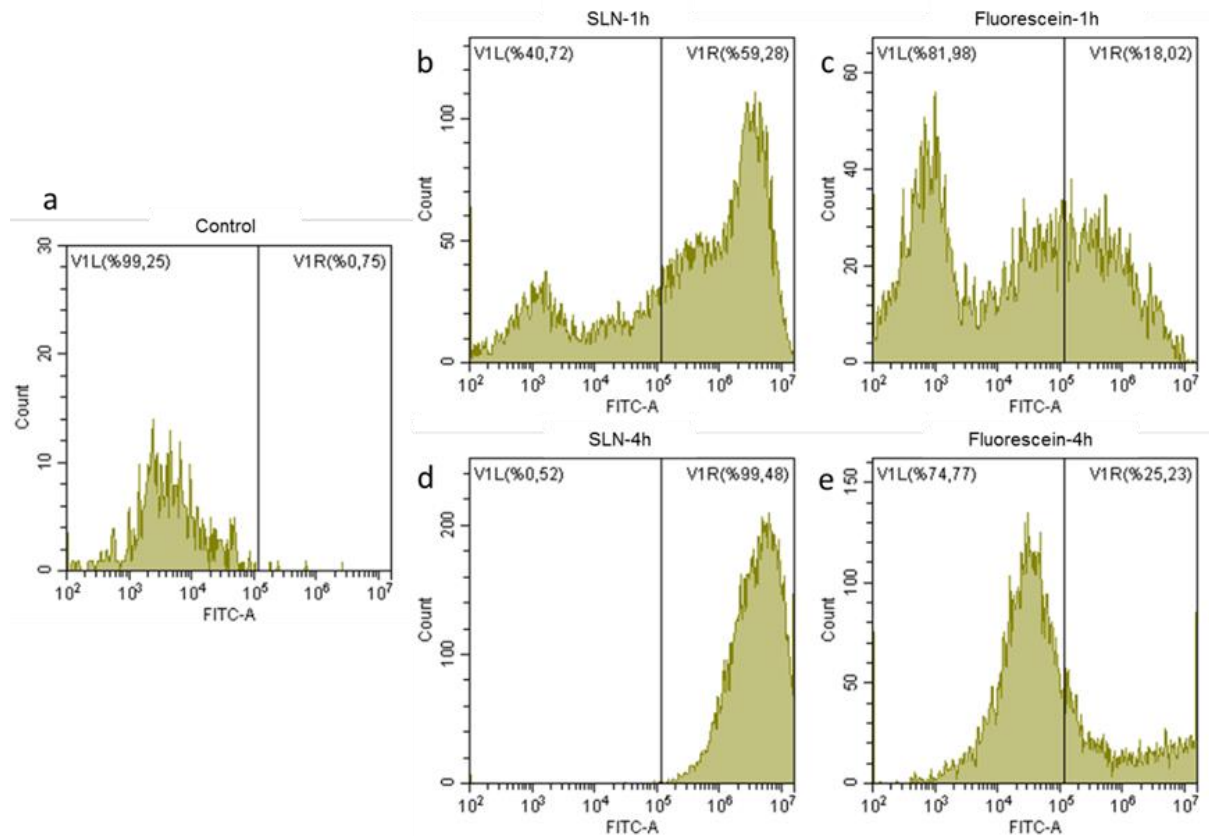


Figure 1. Bacterial uptake of *S. aureus* ATCC 29213

The fluorescein-SLNs entreated bacterial samples were analyzed by fluorescent microscopy to characterize the uptake of nanoparticles by *S. aureus* ATCC 29213. The images indicated by the figures below were obtained after 4 hours of incubation. Figure 2a shows the bright image of *S. aureus* ATCC 29213. Figure 2b points out the fluorescent images of *S. aureus* ATCC 29213 cells, which underlined that just a few bacterial cells internalized the fluorescein solution in a low frequency. Whereas Figure 3b shows the higher amount of bacterial cells have uptaken fluorescein-SLNs. The resulting data show that SLNs are efficient systems for bacterial cell uptake.

In this study, bacterial uptake of fluorescein loaded-SLNs was determined by a flow cytometry method. It constitutes a preliminary study for the use of SLNs and flow cytometry analysis as an alternative method in the fight against antimicrobial resistance in the improvement studies of different antimicrobials or antimicrobial formulations.

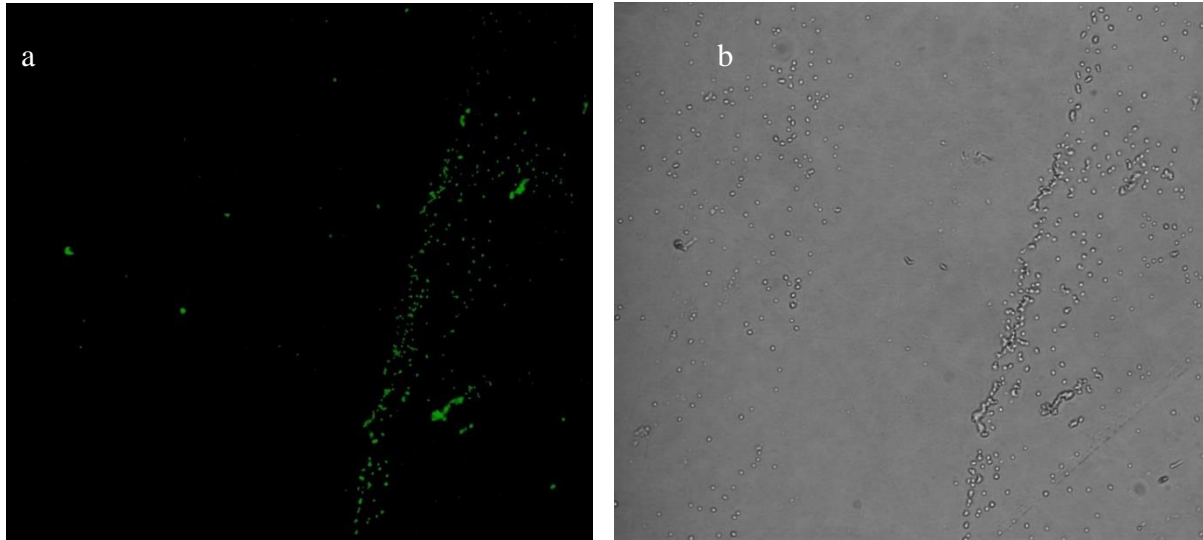


Figure 2a. The bright image of *S. aureus* ATCC 29213, **Figure 2b.** The fluorescent images of *S. aureus* ATCC 29213 cells treated with fluorescein solution

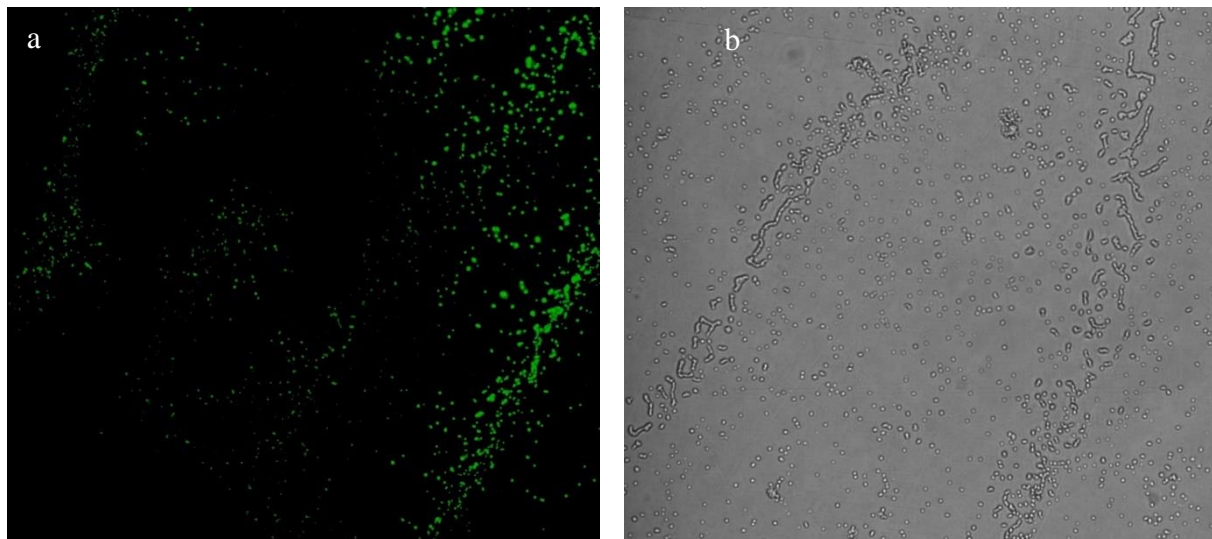


Figure 3a. The bright image of *S. aureus* ATCC 29213 treated with fluorescein-SLNs, **Figure 3b.** The fluorescent images of *S. aureus* ATCC 29213 cells treated with fluorescein-SLNs

AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

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. Arana, L., Gallego, L., Alkorta, I. (2021). Incorporation of antibiotics into solid lipid nanoparticles: a promising approach to reduce antibiotic resistance emergence. *Nanomaterials (Basel)*, 11(5), 1251. [CrossRef]
2. WHO. (2020). Antibiotic resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> Accessed: 25.01.2022.
3. Sofowora, A., Ogunbodede, E., Onayade, A. (2013). The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(5), 210-229. [CrossRef]
4. Yeh, Y.C., Huang, T.H., Yang, S.C., Chen, C.C., Fang, J.Y. (2020). Nano-based drug delivery or targeting to eradicate bacteria for infection mitigation: a review of recent advances. *Frontiers in Chemistry*, 8(286), 1-22. [CrossRef]
5. Jiang, Q., Chen, J., Yang, C., Yin, Y., Yao, K. (2019). Quorum Sensing: A Prospective Therapeutic Target for Bacterial Diseases. *BioMed Research International*, 2019, 2015978. [CrossRef]
6. Lin, D.M., Koskella, B., Lin, H.C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 8(3),162-173. [CrossRef]
7. Gebreyohannes, G., Nyerere, A., Bii, C., Sbhatu, D.B. (2019). Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. *Heliyon*, 5(8), e02192. [CrossRef]
8. Marslin, G., Revina, A.M., Khandelwal, V.K., Balakumar, K., Sheeba, C.J., Franklin, G. (2015). PEGylated ofloxacin nanoparticles render strong antibacterial activity against many clinically important human pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 132, 62-70. [CrossRef]
9. Sheeba, C.J., Marslin, G., Revina, A.M., Franklin, G. (2014). Signaling pathways influencing tumor microenvironment and their exploitation for targeted drug delivery. *Nanotechnology Reviews*, 3(2), 123-151. [CrossRef]

10. Mukherjee, S., Ray, S., Thakur, R.S. (2009). Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(4), 349-358. [\[CrossRef\]](#)
11. Munita, J.M., Arias, C.A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). [\[CrossRef\]](#)
12. Sharma, A., Vaghasiya, K., Ray, E., Verma, R.K. (2018). Nano-encapsulated HHC10 host defense peptide (HDP) reduces the growth of Escherichia coli via multimodal mechanisms. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(3), 156-165. [\[CrossRef\]](#)
13. Tong, S.Y., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., Fowler, V.G. (2015). Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3): 603-661. [\[CrossRef\]](#)
14. Oogai, Y., Matsuo, M., Hashimoto, M., Kato, F., Sugai, M., Komatsuzawa, H. (2011). Expression of virulence factors by Staphylococcus aureus grown in serum. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 8097-8105. [\[CrossRef\]](#)
15. Chambers, H.F., Deleo, F.R. (2009). Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 629-641 [\[CrossRef\]](#)
16. Shapiro, H.M. (2001). Optical measurements in cytometry: Light scattering, extinction, absorption, and fluorescence. *Methods in Cell Biology*, 63, 107-129. [\[CrossRef\]](#)
17. Zucker, R.M., Daniel, K.M. (2012). Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry. *Methods in Molecular Biology*, 906, 497-509. [\[CrossRef\]](#)



HISTOLOGICAL STUDY OF A CORRECTIVE INFLUENCE OF SODIUM 2-((4-AMINO-5-(THIOPHEN-2-YLMETHYL)-4H-1,2,4- TRIAZOL-3-YL)THIO) ACETATE ON THE STATE OF RATS LIVER UNDER CONDITIONS OF ACUTE IMMOBILIZATION STRESS

AKUT HAREKETSİZLİK STRES KOŞULLARINDA SODYUM 2-((4-AMİNO-5-(TİYOFEN-2-İL METİL)-4H-1,2,4-TRİAZOL-3-İL)TİYO) ASETAT'IN SIÇAN KARACİĞERİNİN DURUMU ÜZERİNDEKİ DÜZELTİCİ ETKİSİNİN HİSTOLOJİK ÇALIŞMASI

Andrii SAFONOV^{1*} , Denys DEMIANENKO² , Yevheniia VASHCHYK³ ,
Yuliia LARIANOVSKA⁴ , Dmytro LYTKIN⁴ , Roman SHCHERBYNA¹ ,
Anna OCHERETNIUK⁵ , Svitlana ROMANOVA⁶ 

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

²Sumy National Agrarian University, Faculty of Veterinary Medicine, Postgraduate of Department of Veterinary examination, Microbiology, Zoohygiene and Safety and Quality of livestock products, 40021, Sumy, Ukraine

³National University of Pharmacy, Faculty of Medical and Pharmaceutical Technologies, Department of Veterinary Medicine and Pharmacy, 61000, Kharkiv, Ukraine

⁴Educational and Scientific Institute of Applied Pharmacy, National University of Pharmacy, 61000, Kharkiv, Ukraine

⁵National Pirogov Memorial Medical University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, 21018, Vinnytsya, Ukrain

⁶National University of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 61000, Kharkiv, Ukraine

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Andrii Safonov
e-mail / e-posta: 8safonov@gmail.com, **Phone / Tel.:** +380661777106

ABSTRACT

Objective: *The aim of the work was the histological study of a corrective influence of sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl) thio) acetate on the state of rats liver under conditions of acute immobilization stress.*

Material and Method: *As an object of research sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl) thio) acetate was used. All substances were injected intragastrically, daily for 5 days in appropriate doses on an empty stomach from 9.00-10.00. 1 hour after the last injection, immobilization 6-hour stress was simulated. The central part of the liver was fixed for further histological examination in 10% formaldehyde solution, dehydrated in alcohols of increasing strength, poured into paraffin.*

Result and Discussion: *The results of the study demonstrate the presence of stress-protective properties of sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl) thio) acetate in the model of acute immobilization stress, which was reproduced for 6 hours. As can be seen from the described and presented microscopic picture, the test sample to some extent reduced the degree of stress damage to the liver. In terms of the positive effect on the histological condition of the liver parenchyma (a more pronounced structural orientation of hepatocytes was noted, their beam structure was contoured, dystrophic changes of hepatocytes are less pronounced, round cell infiltrates and foci of hepatocyte necrosis are absent), sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate exhibits a stress-protective effect in the model of acute immobilization stress. We can conclude about similarity of activity of the test sample with comparison drug (Mebicar®) at studying of influence on a histologic condition of a liver parenchyma*

Keywords: *1,2,4-triazole, acute immobilization stress, heterocyclic compounds, histological study*

ÖZ

Amaç: *Çalışmanın amacı, akut immobilizasyon stresi koşulları altında sodyum 2-((4-amino-5-(tiofen-2-ilmetil)-4H-1,2,4-triazol-3-il) tio)asetat'ın sıçan karaciğeri üzerindeki düzeltici etkisinin histolojik açıdan çalışılmasıydı.*

Gereç ve Yöntem: *Araştırmanın konusu olarak sodyum 2-((4-amino-5-(tiofen-2-ilmetil)-4H-1,2,4-triazol-3-il) tio)asetat kullanılmıştır. Tüm maddeler uygun dozlarda 5 gün süreyle günde 9.00-10.00 saatleri arasında aç karnına intragastrik olarak uygulanmıştır. Son enjeksiyondan 1 saat sonra immobilizasyon 6 saatlik stres simüle edilmiştir. Karaciğerin merkezi kısmı, daha sonra yapılacak histolojik incelemeler için %10 formaldehit çözeltisi içinde sabitlenmiş, artan konsantrasyonda alkollerde dehidre edilmiş, parafine dökülmüştür.*

Sonuç ve Tartışma: *Çalışmanın sonuçları, 6 saat boyunca oluşturulan akut immobilizasyon stresi modelinde sodyum 2-((4-amino-5-(tiofen-2-ilmetil)-4H-1,2,4-triazol-3-il) tio)asetat'ın stresten koruyucu özelliklerinin varlığını göstermektedir. Açıklanan ve sunulan mikroskopik resimden görülebileceği gibi, test numunesi bir ölçüde karaciğerdeki stres hasarının derecesini azaltmıştır. Karaciğer parankiminin histolojik durumu üzerindeki olumlu etkisi açısından (hepatositlerin daha belirgin bir yapısal yönelimi gözlenmiştir, giriş yapıları şekillendirilmiştir, hepatositlerin distrofik değişiklikleri daha az belirgindir, yuvarlak hücre infiltratları ve hepatosit nekroz odakları yoktur, sodyum 2-((4-amino-5-(tiofen-2-ilmetil)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tio)asetat, akut immobilizasyon stresi modelinde stres koruyucu bir etki sergilemektedir. Karaciğer parankimasının histolojik koşulları üzerindeki etkileri açısından test örneği ile karşılaştırılan ilacın (Mebicar®) aktivitelerindeki benzerlik ileri sürülebilir.*

Anahtar Kelimeler: *1,2,4-triazol, akut immobilizasyon stresi, heterosiklik bileşikler, histolojik çalışma*

INTRODUCTION

There is a theory that most diseases that occur in humans are caused by stress. In general, stress is a kind of protection of the body against external stimuli. It allows people to better adapt to the modern pace of life. But constant stress causes failures in various body systems (stomach, liver, adrenal glands, thymus, etc.), which leads to fatal consequences [1].

One of the mechanisms to reduce stress is a stress-implementing system that coordinates adaptation processes, but under conditions of strong stress, the system can lead to stress-induced

damage. Studies show that under the influence of immobilization stress there are irreversible changes in blood composition, structure and function of internal organs [2, 3].

There are drugs that in one way or another can reduce the effects of stimuli on the body and thus reduce stress. These are substances with anxiolytic, stress-protective, nootropic and antioxidant effects [4].

1,2,4-Triazole derivatives are of great interest. A huge number of compounds have already been synthesized among 1,2,4-triazole derivatives [5-10]. Some of them have proven themselves as antimicrobial, antifungal, actoprotective, diuretic, antipyretic substances [11-15].

The sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate is a derivative of the 1,2,4-triazole system. This compound belongs to the class of low-toxic substances and has already proven itself as an actoprotective agent [16]. An interesting feature of some anti-stress drugs is not the suppression of efficiency and concentration, but rather increase. Thus, it would be interesting to investigate the anti-stress properties of this compound. The study of morphological changes in the liver is one of the factors of anti-stress properties of the new substance. [17]

The aim of the work was the histological study of a corrective influence of sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate on the state of rats liver under conditions of acute immobilization stress.

MATERIAL AND METHOD

As an object of research sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate (test sample) was used [16]. Taking into account the results of previous studies, a dose of 100 mg / kg was chosen in this experiment, which has already demonstrated the presence of actoprotective properties. Mebicar (Adaptol®, tetramethyltetraazabicyclooctanedione) (a commercial drug with proven anxiolytic, stress-protective, nootropic and antioxidant effects) was used as a comparison drug (reference sample). The range of doses equivalent to the experimental animals for the reference sample (62 mg / kg - 155 mg / kg) was determined taking into account the interspecific difference in body weight and surface area, taking into account the daily therapeutic doses for the clinical. [18] Based on the design of the experiment, a dose of the reference sample of 100 mg / kg was selected, which practically corresponds to the equivalent of the average therapeutic dose for animals and is quantitatively equal to the used dose of the test sample.

Studies of stress-protective properties were performed on 28 white outbred female rats aged 12 months (270 ± 20 g), which were kept in standard conditions for this species (temperature 18-25°C, relative humidity $55 \pm 10\%$, 12:12 hour cycle day-night, with free access to water and food) on the basis of the vivarium of the Educational and Scientific Institute of Applied Pharmacy of the National University of Pharmacy [19]. All stages of the study were conducted in accordance with Directive

2010/63 / EC of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (Minutes of the Commission on Bioethics № 6 of 08.06.2021) [20].

After a period of animal adaptation, it was randomized to minimize differences in mean body weight into 4 experimental groups (7 animals each):

- Negative control (NC) - animals that were not subject to immobilization stress;
- Positive control (PC) - animals subjected to immobilization stress;
- Reference group (RG) - animals that received a reference sample before immobilization stress;
- Experimental group (TG) - animals that received a test sample before immobilization stress.

The test agents were injected intragastrically using a special metal probe in the form of a suspension with purified water (20 mg / ml). The drugs were injected daily for 5 days in appropriate doses on an empty stomach from 9.00-10.00. 1 hour after the last injection, immobilization 6-hour stress was simulated. For immobilization stress the animals were fixed on the plate with their stomach up for 4 limbs [21]. After 6 hours rats were released.

Animals were euthanized humanely in a CO₂ chamber 39 hours after completion of immobilization. The period before euthanasia was due to the period of manifestation of changes at the stage of stress response [21].

From each animal made 7 samples for research. There were 7 animals in each experimental group. Microscopic examination was performed on all fields of view of each sample.

Liver samples were fixed in 10% formalin solution. Then the samples were washed with water, then - dehydration of samples in ethyl alcohol of increasing concentration (50, 60, 70, 80, 96%). After that, the samples were alternately placed in an alcohol-chloroform mixture, then in pure chloroform, then in chloroform-paraffin suspension, then the samples were poured into pure paraffin. Micropreparations (the thickness is 5µm) were stained with Hematoxylin® Harrisa and Eosin® Diapath (Italy).

Examination of was performed under a Granum light microscope, microscopic images were photographed with a Granum DSM 310 digital video camera. Photos were processed using Toup View.

RESULT AND DISCUSSION

As shown by microscopy, liver tissue had a typical structure for this species for intact rats from the group of negative control. The particles are not separated from each other by connective tissue layers. Their limit is determined by triads. Zones of triads (portal tracts) are narrow. The hepatic lobules are formed by a system of beams, which are interconnected. The plates themselves consisted of a series of hepatocytes, which are located fairly regular radial strands. The most pronounced radial direction of cell strands is centrilobular. Hepatocytes had a characteristic polygonal shape, their border is quite clear. Cell nuclei of regular round

shape, located centrally. Heterogeneity of nucleus size within the physiological norm. The vast majority of nuclei contained one large enough nucleolus, two or more - much less often. Dinuclear hepatocytes were quite common. The cytoplasm of hepatocytes is uniformly stained, optically dense, and small accumulations of fine-grained basophilic material are visible in the perinuclear zone. No inclusions visible in the cytoplasm at the optical level were determined, mitosis was not visible in the cells. The lumen of the intraparticle sinusoidal hemocapillaries is normal, as a rule, it did not contain blood, a moderate number of lymphoid cells was observed. Stellate reticuloendotheliocytes (Kupffer cells) are without features. The condition of the epithelium of the bile ducts and endothelium of the terminal branches of blood vessels (veins, arteries) in the triads, as well as the endothelium of other blood vessels, is within normal limits (Figure 1).

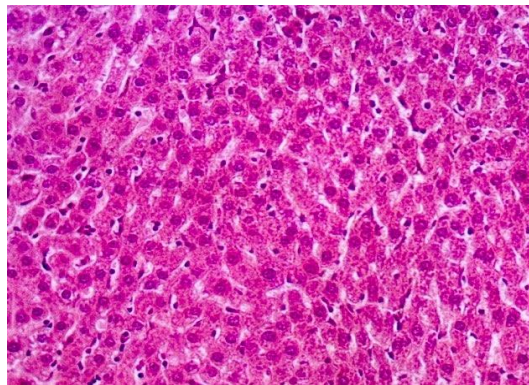


Figure 1. The liver of an intact rat (NC) The radial orientation of the hepatocyte strands is not violated, the lumen of the hemocapillaries is normal, does not contain blood. Hematoxylin-eosin. x200.

39 hours after 6 hours of immobilization stress, the cytoarchitectonics of rat liver was focally disturbed - loss of radial orientation of hepatocytes were revealed. Mostly more affected periportal lobules and perivascular areas. The hepatocytes of these areas are of varying severity dystrophic (hydropic, balloon dystrophy in combination with lipid dystrophy) changes. Some of the cells are in a state of decay (Figure 2).

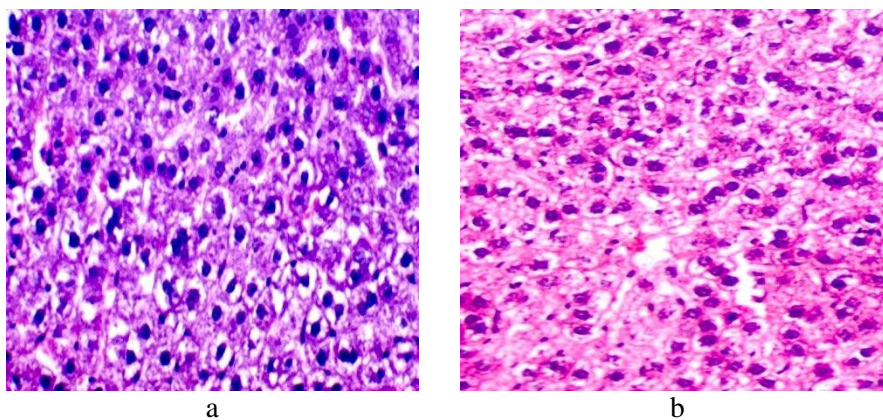


Figure 2. Rat liver 39 hours after immobilization stress (PC): a - violation of the radial orientation of hepatocytes, balloon-lipid cell dystrophy; b - decay of some hepatocytes. Hematoxylin-eosin. x250.

There is a clear venous plethora. Focal sinusoidal blood capillaries are clearly dilated, full-blooded, marked erythrocyte sludge (Figure 3).

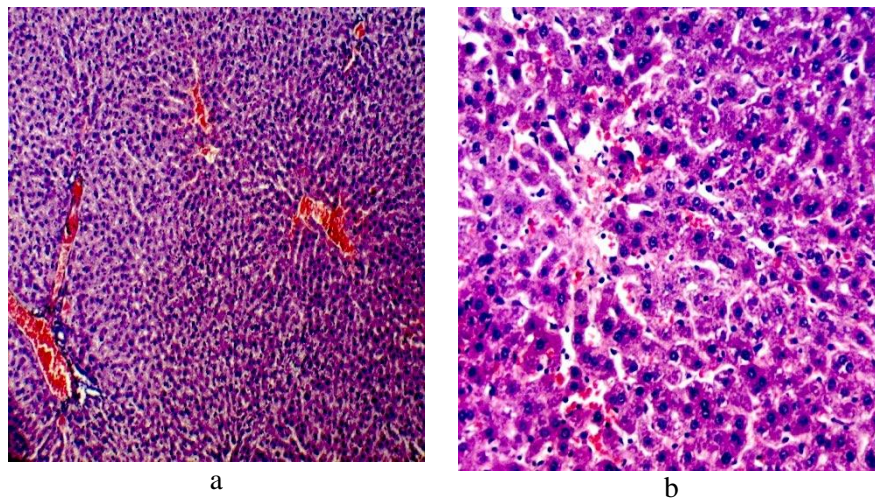


Figure 3. Rat liver 39 hours after immobilization stress (PC): a - pronounced plethora of venous vessels (x100); b - dilation and fullness of blood capillaries (x200). Hematoxylin-eosin.

In addition, in some animals, round cell infiltrates of perivascular and around triads, foci of hepatocyte necrosis with cellular infiltration of dead cells were found to be of different severity (Figure 4).

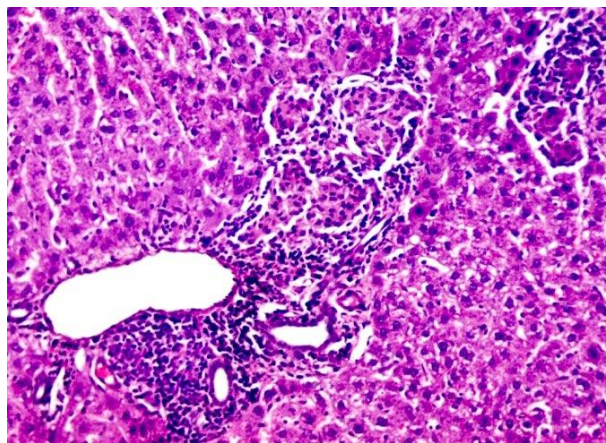


Figure 4. Rat liver 39 hours after immobilization stress (PC). Distinct round-cell infiltration in the triad zone, foci of hepatocyte necrosis with cellular infiltration of dead cells. Hematoxylin-eosin. x200.

There was a decrease in dinuclear hepatocytes, more noticeable near the areas of violation of the cytoarchitectonics of the parenchyma, an increase in cells with signs of apoptosis (intense eosinophilic cytoplasm and pyknotic nucleus), the appearance of hepatocytes with hypertrophic nuclei (Figure 5).

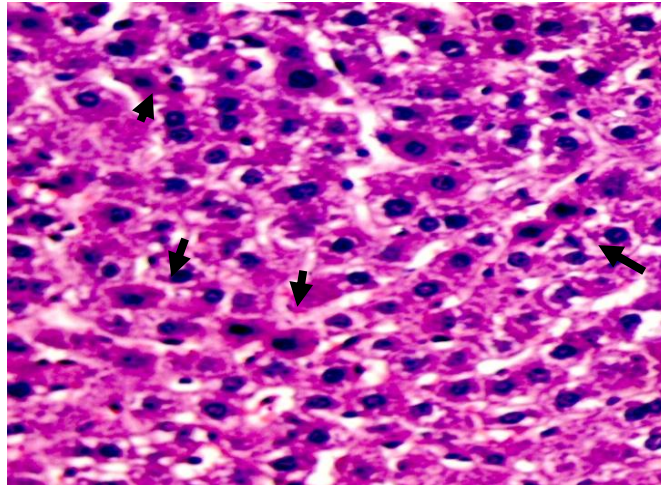


Figure 5. Rat liver 39 hours after immobilization stress (PC). Increase in cells with signs of apoptosis (arrows), appearance of cells with hypertrophic nuclei, decrease in dinuclear hepatocytes. Hematoxylin-eosin. x400.

The obtained microscopic data correspond to the histological picture of stress liver damage at the stage of anxiety (end of stage) stress response [17, 22].

After prophylactic use of the reference drug in 60% of rats there was a more pronounced beam orientation of hepatocytes (although the areas of violation of cytoarchitectonics were still quite large). Both hepatocytes without signs of dystrophy and altered parenchymal cells were detected in these areas, but the severity of dystrophic changes was reduced compared with control pathology. In most rats there was a fairly pronounced fullness of venous vessels, sinusoidal capillaries (Figure 6), different severity of hepatocyte necrosis (Figure 7), moderately weak round cell infiltration perivascularly (Figure 8).

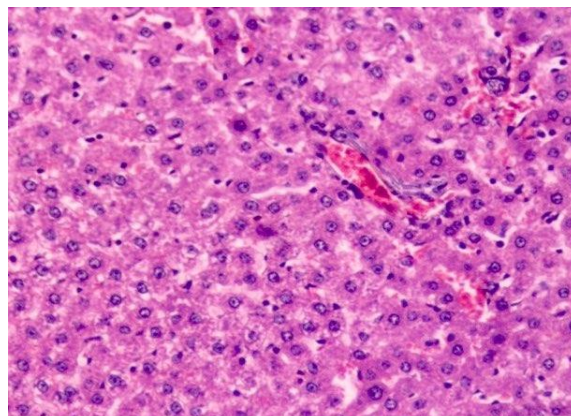


Figure 6. Liver of a rat injected with a reference drug for immobilization stress (RG). More pronounced beam orientation of hepatocytes, reduction of manifestations of cell dystrophy, venous plethora of venous structures. Hematoxylin-eosin. x250.

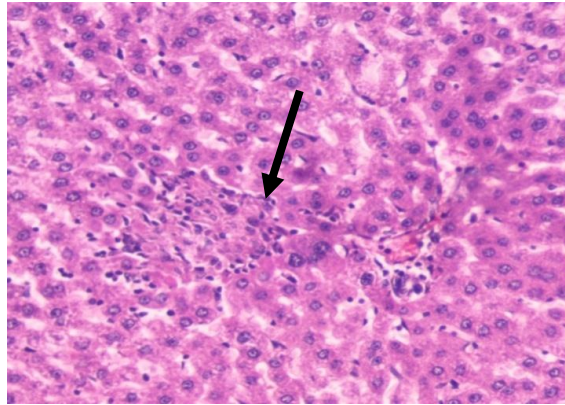


Figure 7. The liver of a rat, which was injected with a reference drug (RG). The focus of hepatocyte necrosis. Hematoxylin-eosin. x250.

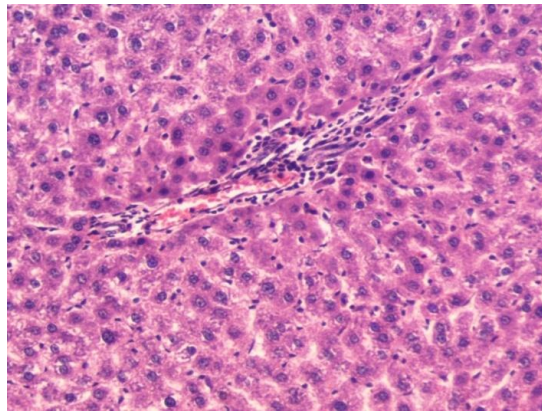


Figure 8. Liver of rat, which was injected with a reference drug (RG). Moderate infiltration of portal tract structures. Hematoxylin-eosin. x250.

Certain structural shifts were noted in 66.7% of rats against the background of the test sample, which are aimed at normalizing the cytoarchitectonics of the liver parenchyma. Thus, a more pronounced structural orientation of hepatocytes was noted, their beam structure was contoured, and the foci of violation were narrowed (Figure 9).

Dystrophic changes of hepatocytes are less pronounced, round cell infiltrates (perivascular and around triads) and foci of hepatocyte necrosis are absent. Venous plethora is significantly less, the presence of binuclear cells is increased (Figure 10).

The obtained microscopic data indicate the presence of a fairly effective protection of the liver parenchyma of these rats during the prophylactic injection of the test sample. In other animals, the signs of stress damage to the liver parenchyma at the stage of anxiety were more pronounced, in severity they are close to the control (positive control) indicators (Figure 11).

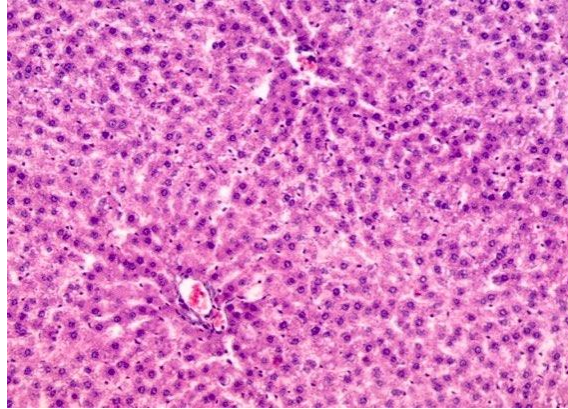


Figure 9. The liver of a rat that was injected with a test sample (TG). More pronounced structural orientation of hepatocytes. Hematoxylin-eosin. x200.

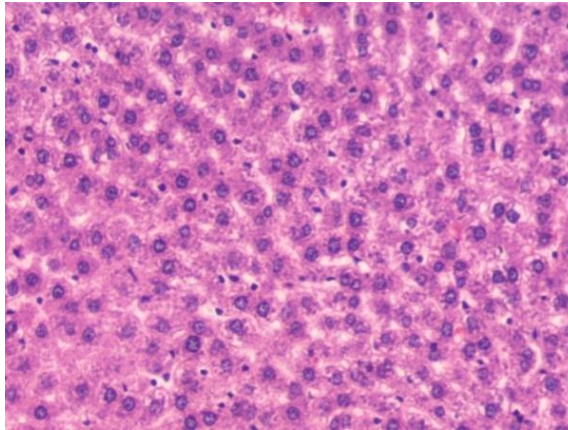


Figure 10. The liver of a rat, which was injected with a test sample (TG). Reducing the severity of hepatocyte dystrophy, venous plethora of sinusoidal capillaries. Hematoxylin-eosin. x250.

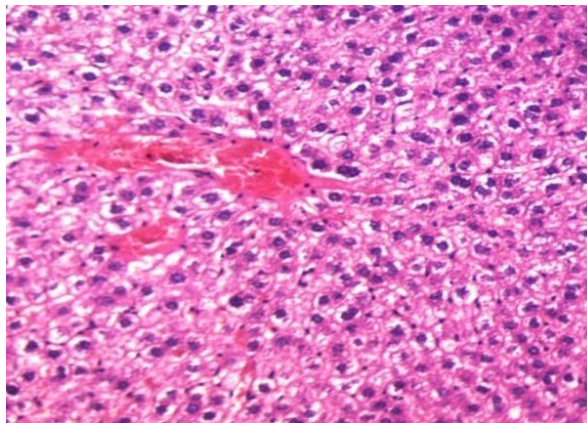


Figure 11. The liver of a rat that was injected with a test sample (TG). The severity of signs of stress damage to the liver parenchyma. Hematoxylin-eosin. x250.

In conclusion, the results of the study demonstrate the presence of stress-protective properties of sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate in the model of acute immobilization stress, which was reproduced for 6 hours.

As can be seen from the described and presented microscopic picture, the test sample to some extent reduced the degree of stress damage to the liver. In terms of the positive effect on the histological condition of the liver parenchyma (a more pronounced structural orientation of hepatocytes was noted, their beam structure was contoured, dystrophic changes of hepatocytes are less pronounced, round cell infiltrates and foci of hepatocyte necrosis are absent), sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate exhibits a stress-protective effect in the model of acute immobilization stress.

We can conclude about similarity of activity of the test sample with comparison drug (Mebicar®) at studying of influence on a histologic condition of a liver parenchyma.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: *A.S., D.D., Y.V., Y.L., D.L.*; Design: *R.Sh., A.O., S.R.*; Control: *A.S., D.D., Y.V.*; Sources: *Y.L., D.L.*; Materials: *R.Sh., A.O., S.R.*; Data Collection and processing: *Y.L., D.L., R.Sh.*; Analysis and interpretation: *A.S., D.D., Y.V.*; Literature review: *A.O., S.R., Y.L.*; Manuscript writing: *A.S., D.D.*; Critical review: *A.S., D.D., Y.V., Y.L., D.L., R.Sh., A.O., S.R.*; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

Minutes of the Commission on Bioethics № 6 of 08.06.2021 by National University of Pharmacy

REFERENCES



1. Sahakyan, N.A., Shogeryan, S.A., Simonyan, L.Y., Avanesyan, L.G. (2017). The effect of taurine on heart rate variability and structural and functional changes in the liver and adrenal glands during immobilization stress. *Biological Journal of Armenia*, 69(1), 61-67. From <http://test.journals.sci.am/index.php/sci-armenian-biology/article/view/1342>. Accessed date: 10.04.2022.
2. Lomakina, Y.V., Bulyk, R.E., Chernovskaya, N.V. (2015). Stress-limiting system of an aging organism under immobilization stress. *Priority Directions of Development of Science and Education*, 2, 14-15. From <https://interactive-plus.ru/e-articles/138/Action138-9894.pdf>. Accessed date: 10.04.2022.
3. Prokudina, E.S., Gorbunov, A.S., Kazakov, V.A., Saushkin, V.V., Maslov, L.N. (2019). Morphofunctional aspects of heart damage during immobilization stress in rats. *Russian Physiological Journal IM Sechenov*, 105(2), 248-257. [CrossRef]
4. Sameliuk, Y., Kaplaushenko, T., Al Zedan, F. (2021). 1,2,4-Triazole derivatives in medicine and pharmacy and application prospects. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 45(3), 598-614. [CrossRef]
5. Shcherbyna, R. (2019). Microwave-assisted synthesis of some new derivatives of 4-substituted-3-(morpholinomethyl)-4H-1,2,4-triazole-5-thioles. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 43(3), 220-229. [CrossRef]
6. Safonov, A. (2020). Microwave synthesis of new N-R-3-(alkylthio)-5-(thiophen-2-ylmethyl)-1,2,4-triazol-4-amines. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 44(1), 89-98. [CrossRef]
7. Shcherbyna, R.A., Panasenko, A.I., Knysh, E.G., Varinsky, B.A. (2014). Synthesis and physicochemical properties of 2-((4-R-3-(morpholinomethylene)-4H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)acetic acids. *Aktual'ni Pitannâ Farmaceutičnoi i Medičnoï Nauki ta Praktiki*, 3(16), 18-21. [CrossRef]
8. Hulina, Y.S., Kaplaushenko, A.G. (2018). Synthesis, physical and chemical properties of 5-((1H-tetrazole-1-yl) methyl)-4-R-4H-1, 2, 4-triazole-3-thiols and their chemical transformations. *Biopharmaceutical Journal*, 10(1), 26-30. From <https://elibrary.ru/item.asp?id=32694739>. Accessed date: 10.04.2022.
9. Shcherbyna, R., Parchenko, V., Varynskyi, B., Kaplaushenko, A. (2019). The development of HPLC-DAD method for determination of active pharmaceutical ingredient in the potassium 2-((4-amino-5-(morpholinomethyl)-4H-1, 2, 4-triazol-3-yl) thio) acetate substance. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 32(1), 5-9. [CrossRef]
10. Frolova, Y., Kaplaushenko, A., Nagornaya, N. (2020). Design, synthesis, antimicrobial and antifungal activities of new 1,2,4-triazole derivatives containing 1H-tetrazole moiety. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 44(1), 70-88. [CrossRef]
11. Shcherbyna, R. (2020). An investigation of the pharmacokinetics and potential metabolites of potassium 2-((4-amino-5-(morpholinomethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate on rats. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 44(2), 233-241. [CrossRef]

12. Shcherbyna, R., Vashchyk, Y. (2019). The research of 1,2,4-triazole derivatives hepatoprotective activity under tetracycline and infectious hepatitis. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 43(2), 135-146. [CrossRef]
13. Vashchyk, Y., Shcherbyna, R., Parchenko, V., Bushueva, I., Gutyj, B., Fotna, H., Fotna, T., Stronskyi, Y. (2020). Histological study of a corrective influence of a compound potassium 2-((4-amino-5-(morpholinomethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate (PKR-173) on the state of chicken's liver under infection by pseudomonas aeruginosa. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 44(1), 1-17. [CrossRef]
14. Shcherbyna, R., Parchenko, V., Martynyshyn, V., Hunchak, V. (2018). Evaluation of acute and subacute toxicity of oil liniment based on 4-((5-(decylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)methyl)morpholine. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 42(1), 43-52. [CrossRef]
15. Samelyuk, Y.G., Kaplaushenko, A.G. (2014). Synthesis of 3-alkylthio (sulfo)-1,2,4-triazoles, containing methoxyphenyl substituents at C5 atoms, their antipyretic activity, propensity to adsorption and acute toxicity. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(5), 1117-1121. From <https://www.jocpr.com/articles/synthesis-of-3alkylthiosulfo124triazoles-containing-methoxyphenyl-substituents-at-c5-atoms-their-antipyretic-activity-pr.pdf>. Accessed date: 10.04.2022.
16. Knysh, Y.G., Panasenko, O.I., Safonov, A.A. (2016). Sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate, which shows actoprotective activity. *Patent of Ukraine № 112619*, Patent published on 26.09.2016, bulletin. № 18/2016. From <https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=227417>. Accessed date: 10.04.2022.
17. Vyborova, I.S., Khandzhav, U., Vasilieva, L.S., Makarova, N.G. (2005). The structure of the liver in rats in the dynamics of immobilization stress. *Siberian Medical Journal (Irkutsk)*, 52 (3), 30-33. From <https://cyberleninka.ru/article/n/struktura-pecheni-u-krysv-v-dinamike-immobilizatsionnogo-stressa> Retrieved March 21, 2022. Accessed date: 10.04.2022.
18. Nair, A. B., Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 7(2), 27. [CrossRef]
19. National research council. (2011). Guide for the care and use of laboratory animals: eighth edition, Washington, DC: The National Academies Press, p.246. [CrossRef]
20. Union, E. (2010). Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*, 276, 33-79. From <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF> Accessed date 21.03.2022. Accessed date: 10.04.2022.
21. Mironov, A. K. (2012). Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one, M. Grifi K. p.944.
22. Ivanov, A.V., Bobyntsev, I.I., Shepeleva, O.M., Kryukov, A.A., Andreeva, L.A., Myasoedov, N.F. (2017). Morphological changes in the liver of rats under stress and their features after the introduction of Semax. *Morphology*, 151(1), 39-43. From ftp://fulltext.kursksmu.net/fulltext/Publications_KGMU/2017/morfologicheskie.pdf Accessed date: 21.03.2022.



LEAF ANATOMY OF *INULA PEACOCKIANA* (AITCH. & HEMSL.) KOROVIN

INULA PEACOCKIANA (AITCH. & HEMSL.) KOROVIN'NIN YAPRAK ANATOMİSİ

Mert İLHAN^{1*} , Muhammed Mesud HÜRKUL² 

¹Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 65080, Van,
Turkey

²Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany, 06560, Ankara,
Turkey

ABSTRACT

Objective: *Inula peacockiana*, which is called "uzunandızotu" in Turkey, is a stout perennial herbaceous plant with yellow flowers, grow up to 2 m. It is a plant belonging to the Asteraceae family, which has medicinal value. The safe use of medicinal plants depends on their correct diagnosis. The anatomical features of the leaves are valuable in diagnosing plants correctly. In this study, the anatomical features of the basal leaf, petiole and cauline leaf of *I. peacockiana* were investigated.

Material and Method: Plant materials were collected from Van (Turkey). A voucher specimen was deposited in the VANF Herbarium. The samples for anatomical studies were preserved in 70% alcohol. The transverse and surface sections were cutted by hand with razor blade in microscopic preparation form. The chloral hydrate solution was used in microscopic examinations.

Result and Discussion: The basal and cauline leaves are dorsiventral and contain cover and glandular hairs. The main vein protrudes outward in the midrib of the both leaves. Different the basal leaf, the cauline leaf contains more glandular hairs on the upper surface and cover hairs on the lower surface. In both leaves, ranunculaceae type stomata were observed in the upper and lower epidermis. The simple arc-shaped petiole includes of numerous separate bundles embedded in the parenchymatous cells. The epidermal layer consist of numerous cover and glandular hairs.

Keywords: Basal leaf, cauline leaf, *Inula peacockiana*, petiole, plant anatomy

ÖZ

Amaç: Türkiye'de "uzunandızotu" olarak adlandırılan *Inula peacockiana*, 2 m'ye kadar boyolanabilen, sarı çiçekli, güçlü, çok yıllık otsu bir bitkidir. Asteraceae familyasına ait tıbbi değeri olan bir bitkidir. Tıbbi bitkilerin güvenli kullanımı doğru teşhislerine bağlıdır. Yaprakların anatomik özellikleri, bitkilerin doğru teşhis

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Mert İlhan
e-mail / e-posta: mertilhan@yyu.edu.tr, **Phone / Tel.:** +904324445065

edilmesinde önemlidir. Bu çalışmada *I. peacockiana*'nın taban yaprağı, yaprak sapı ve gövde yaprağının anatomik özellikleri incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Bitki materyalleri Van'dan (Türkiye) toplanmıştır. VANF Herbaryumuna bir örnek kaydedilmiştir. Anatomik çalışmalar için numuneler %70 alkolde korunmuştur. Enine ve yüzey kesitler bir jilet yardımıyla el ile alınmıştır. Mikroskopik incelemelerde kloralhidrat solüsyonu kullanılmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Taban ve gövde yaprakları dorsiventraldır, örtü ve salgı tüyleri içerir. Her iki yaprağın orta damarı dışı doğru çıkıntı yapmıştır. Taban yaprakta farklı olarak, gövde yaprağının üst yüzeyinde daha fazla salgı tüyü, alt yüzeyinde ise örtü tüyleri bulunur. Her iki yaprakta da üst ve alt epidermada ranunculaceae tipi stomalar gözlenmiştir. Basit yay şeklindeki taban yaprak sapının enine kesiti, parankimatik hücrelere gömülü çok sayıda ayrı iletim demet içerir. Epiderma çok sayıda örtü ve salgı tüyleri taşır.

Anahtar Kelimeler: Bitki anatomisi, gövde yaprağı, *Inula peacockiana*, petiyol, taban yaprağı

INTRODUCTION

The Asteraceae family is represented by 1677 genera worldwide and the genus *Inula* L. is naturally distributed in a wide region from temperate Eurasia to Indo-China, including Tropical and South Africa, Madagascar [1].

Inula species contain eudesmanolides, guaianolides, pseudoguaianolides, germacranolides, xanthanolides, dimeric sesquiterpenes and flavonoids [1-9]. The species of the genus have antibacterial, hypoglycaemic, hypolipidemic, cytotoxic, genotoxic, antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic, antiviral, antifungal, immunomodulatory, cardioprotective and antihypertensive effects [10-25].

Inula peacockiana (Aitch. & Hemsl.) Korovin, which is called "uzunandızotu" in Turkey [26], is a stout perennial herbaceous plant with yellow flowers, grow up to 2 m. Basal leaves of the plant are oblong or ovate, acute or subacute at apex, villous-pubescent and minutely glandular. The cauline leaves are smaller and sessile [27].

In this study, leaf anatomy of *I. peacockiana*, which belongs to the medically important genus *Inula*, was investigated.

MATERIAL AND METHOD

Plant materials

Plant materials were collected from Van (Turkey) (38°51'37.5"N 43°26'46.8"E) in June of 1st, 2021 (Figure 1). The identification of samples were carried out by Assoc. Prof. Mesut Pınar from Department of Botany, Faculty of Science, Van Yüzüncü Yıl University. A voucher specimen was deposited in the VANF Herbarium in Turkey (VANF 165228).

Light microscopy analysis

The samples for anatomical studies were preserved in 70% alcohol. The transverse and surface sections were cutted by hand with razor blade in microscopic preparation form. The chloral hydrate

solution was used in microscopic examinations. The anatomical analysis and the microphotographs were taken using the Leica DM 4000B [28].



Figure 1. General view of *I. peacockiana*

RESULT AND DISCUSSION

Basal leaf

Transverse and surface sections of basal leaf were observed as in Figure 2. The leaf is dorsiventral. Upper and lower epidermis cells were observed as square-rectangular. The epidermal cells of both layers do not differ in size, the upper and lower epidermal layers contain stomata, glandular and covering hairs. The leaf is protruding in the adaxial and abaxial sides in the midrib. In the adaxial part of the midrib, the sub-epidermis is covered with 1-3 rows of collenchyma tissue. In the main vein, the xylem is surrounded by a crescent-shaped phloem. The main vein is protected in both sides by the sclerenchymatous cap. A ring of parenchymatous cells is surrounded the main vein and the sclerenchymatous tissue. The mesophyll layer consists of palisade parenchyma cells and oval-shaped sponge parenchyma cells. In the surface sections of the leaf, the number of cells adjacent to the stoma was observed as 4-5 in the upper epidermis and 4-7 in the lower epidermis. The glandular hairs of leaf are composed a multiseriate stalk and a multicellular head. In addition, multicellular cover hairs are located both the epidermal layers.

Petiole of basal leaf

In the cross section of the simple arc-shaped petiole, numerous separate bundles embedded in the parenchymatous cells are observed. The epidermal layer consist of numerous cover hairs and glandular

hairs. The stoma was not observed. The cover hairs are simple, multicellular, the cell of distal end of hairs are more elongated. The glandular hairs of petiole are composed a multiseriate stalk and a multicellular head. The sub-epidermal layer is covered by a tissue consisting of suberized cells on the adaxial side. Separated vascular bundles are embedded in the parenchymatous tissue and support each bundle from the abaxial side to the crescent-shaped sclerenchyma (Figure 3).

Cauline leaf

The leaf is dorsiventral. Upper and lower epidermis cells were observed as square-rectangular. The epidermal cells of both layers do not differ in size, the upper and lower epidermal layers contain stomata, glandular and covering hairs. Leaf protrudes in both sides on midrib, the abaxial side more than adaxial. The sub-epidermis of the midrib is covered with collenchyma tissue both sides. In the main vein, the xylem is surrounded by a crescent-shaped phloem and the sclerenchymatous arc is located abaxial side of the phloem. A ring of parenchymatous cells is surrounded the main vein. The mesophyll layer consists of palisade parenchyma cells and oval-slightly elongated sponge parenchyma cells. In the surface sections of the leaf, the number of cells adjacent to the stoma was observed as 4-5 in the upper epidermis and the lower epidermis. Both epidermis layers contain cover hairs and glandular hairs. The glandular hairs are denser in the upper epidermis and the covering hairs in the lower epidermis. The glandular hairs are composed a multiseriate stalk and a multicellular head. The cover hairs are simple, multicellular, the cells of distal end of hairs elongated (Figure 4).

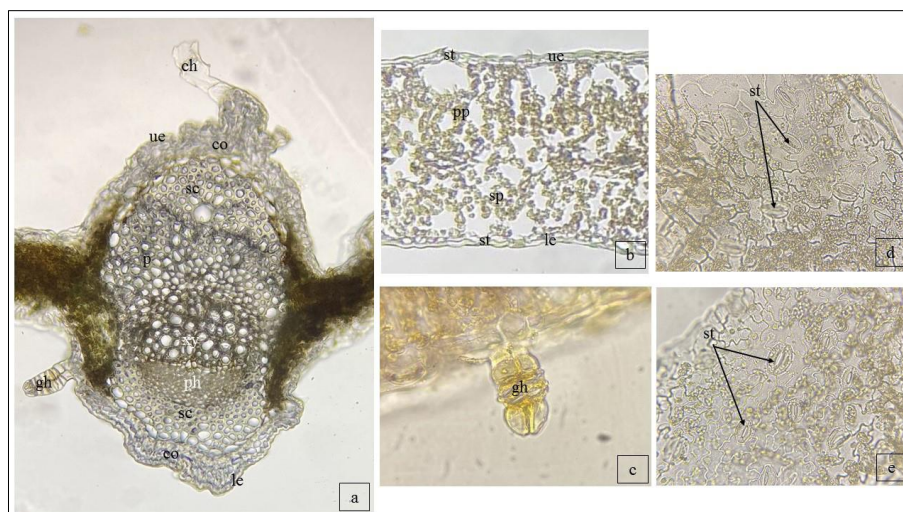


Figure 2. Anatomical features of basal leaf

a: Transverse section of midrib (x4), b: Transverse section of lamina (x10), c: Glandular hair in leaf transverse section (x40), d: Surface section of upper epidermis (x40), e: Surface section of lower epidermis (x40), ch: covering hair, co: collenchyma, gh: glandular hair, le: lower epidermis, ph: phloem, pp: palisade parenchyma, sc: sclerenchyma, sp: spongy parenchyma, st: stomata, ue: upper epidermis, xy: xylem

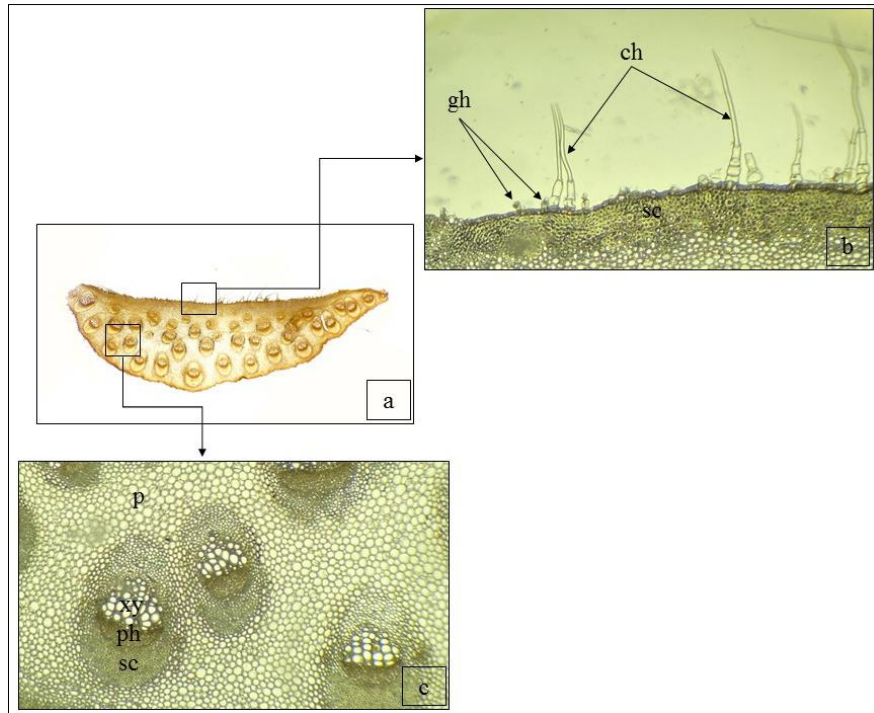


Figure 3. Anatomical features of petiole

a: Transverse section of petiole (x4), b: Transverse section of petiole (x40), c: Transverse section of petiole (x40), ch: covering hair, gh: glandular hair, ph: phloem, p: parenchyma, sc: sclerenchyma, xy: xylem

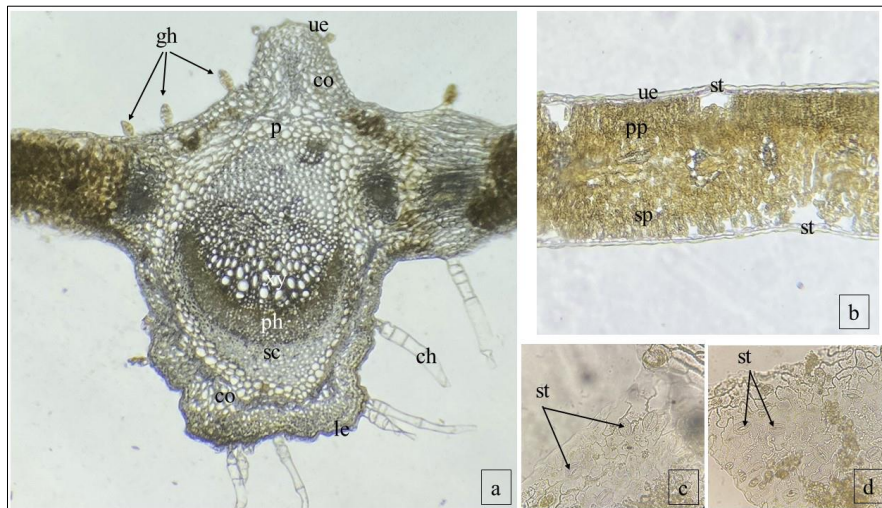


Figure 4. Anatomical features of cauline leaf

a: Transverse section of midrib (x4), b: Transverse section of lamina (x10), c: Surface section of upper epidermis (x40), d: Surface section of lower epidermis (x40), ch: covering hair, co: collenchyma, gh: glandular hair, le: lower epidermis, ph: phloem, pp: palisade parenchyma, sc: sclerenchyma, sp: spongy parenchyma, st: stomata, ue: upper epidermis, xy: xylem

The results showed that both the basal and cauline leaves are dorsiventral. Basal leaf and cauline leaf differ in terms of midrib. The midrib protrudes ad- and abaxial sites in both leaf types. However, in the cauline leaf, the midrib clearly shows more doming in the abaxial site. In addition, the upper and lower epidermis of both leaves contain cover and glandular hairs. However, the upper epidermis of cauline leaf rich in glandular hairs and the lower epidermis rich in cover hairs. The leaves and petiole differ in cover hairs. The cover hairs on leaves and petiole are multicellular, simple, but the cells of the distal end of the cover hairs on the petiole epidermis are relatively longer. Previous studies on the Asteraceae family have shown that the family contains cover hairs of different structures [29]. In the report of Metcalfe and Chalk [29] about the Compositae family, the dorsiventral leaves, the presence of cover and glandular hairs and the presence of ranunculaceae type stomata are compatible with this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception: *M.İ.*; Design: *M.İ.*, *M.M.H.*; Supervision: *M.İ.*; Resources: *M.İ.*, *M.M.H.*; Materials: *M.İ.*; Data collection and/or processing: *M.İ.*, *M.M.H.*; Analysis and/or interpretation: *M.İ.*, *M.M.H.*; Literature search: *M.İ.*, *M.M.H.*; Writing manuscript: *M.İ.*; Critical review: *M.İ.*, *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. Plants of the World Online Web site. (2022). Retrieved January 23, 2022, from <http://www.plantsoftheworldonline.org>
2. Qi, J.L., Fu, Y., Shi, X.W., Wu, Y.B., Wang, Y.Z., Zhang, D.Q., Shi, Q.W. (2008). Sesquiterpene lactones and their anti-tumor activity from the flowers of *Inula britannica*. *Letters in Drug Design & Discovery*, 5(7), 433-436. [\[CrossRef\]](#)
3. Chin, Y.W., Yoon, K.D., Kim, J. (2009). Cytotoxic anticancer candidates from terrestrial plants. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 9(8), 913-942. [\[CrossRef\]](#)
4. Zhang, T., Xiao, W., Gong, T., Yang, Y., Chen, R.Y., Yu, D.Q. (2010). Two new eudesmanolides from *Inula racemosa*. *Journal of Asian natural products research*, 12(9), 788-792. [\[CrossRef\]](#)

5. Cheng, X.R., Li, W.W., Ren, J., Zeng, Q., Zhang, S.D., Shen, Y.H., Yan, S.-K., Ye, J., Jin, H.-Z., Zhang, W.D. (2012). Sesquiterpene lactones from *Inula hookeri*. *Planta Medica*, 78(05), 465-471. [\[CrossRef\]](#)
6. Gökbulut, A., Kaiser, M., Brun, R., Sarer, E., Schmidt, T.J. (2012). 9 β -hydroxyparthenolide esters from *Inula montbretiana* and their antiprotozoal activity. *Planta Medica*, 78(03), 225-229. [\[CrossRef\]](#)
7. Stojanović-Radić, Z., Čomić, L., Radulović, N., Blagojević, P., Denić, M., Miltojević, A., Rajković, J., Mihajilov-Krstev, T. (2012). Antistaphylococcal activity of *Inula helenium* L. root essential oil: eudesmane sesquiterpene lactones induce cell membrane damage. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 31(6), 1015-1025. [\[CrossRef\]](#)
8. Talib, W.H., Zarga, M.H.A., Mahasneh, A.M. (2012). Antiproliferative, antimicrobial and apoptosis inducing effects of compounds isolated from *Inula viscosa*. *Molecules*, 17(3), 3291-3303. [\[CrossRef\]](#)
9. Seca, A.M., Grigore, A., Pinto, D.C., Silva, A.M. (2014). The genus *Inula* and their metabolites: from ethnopharmacological to medicinal uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 154(2), 286-310. [\[CrossRef\]](#)
10. Zeggwagh, N.A., Ouahidi, M.L., Lemhadri, A., Eddouks, M. (2006). Study of hypoglycaemic and hypolipidemic effects of *Inula viscosa* L. aqueous extract in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(2), 223-227. [\[CrossRef\]](#)
11. Kaileh, M., Berghe, W.V., Boone, E., Essawi, T., Haegeman, G. (2007). Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(3), 510-516. [\[CrossRef\]](#)
12. Oskay, M., Oskay, D., Kalyoncu, F. (2009). Activity of some plant extracts against multi-drug resistant human pathogens. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 8, 293-300.
13. Kattouf, J., Belmoukhtar, M., Harnafi, H., Mekhfi, H., Ziyat, A., Aziz, M., Bnouham, M., Legssyer, A. (2009). Antihypertensive effect of an aqueous extract of *Inula viscosa* leaves. *Phytothérapie*, 7(6), 309-312. [\[CrossRef\]](#)
14. Celik, T.A., Aslanturk, O.S. (2010). Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Inula viscosa* leaf extracts with *Allium*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 189252. [\[CrossRef\]](#)
15. Lee, N.H., Hong, J.I., Kim, J.Y., Chiang, M.H. (2009). Antioxidant properties and protective effects of *Inula britannica* var. *chinensis* regel on oxidative stress-induced neuronal cell damage. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 41(1), 87-92.
16. Wang, J., Wang, N., Yao, X., Ishii, R., Kitanaka, S. (2006). Inhibitory activity of Chinese herbal medicines toward histamine release from mast cells and nitric oxide production by macrophage-like cell line, RAW 264.7. *Journal of natural medicines*, 60(1), 73-77. [\[CrossRef\]](#)
17. Shan, J.J., Yang, M., Ren, J.W. (2006). Anti-diabetic and hypolipidemic effects of aqueous-extract from the flower of *Inula japonica* in alloxan-induced diabetic mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(3), 455-459. [\[CrossRef\]](#)
18. Somesh, T., Goel, K.K., Nidhi, G. (2011). Antiinflammatory activity of *Inula cuspidata* leaf extract. *Asian Journal of Chemistry*, 23(2), 943-944.

19. Gebre-Mariam, T., Neubert, R., Schmidt, P.C., Wutzler, P., Schmidtke, M. (2006). Antiviral activities of some Ethiopian medicinal plants used for the treatment of dermatological disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(1-2), 182-187. [[CrossRef](#)]
20. Pal, H.C., Sehar, I., Bhushan, S., Gupta, B.D., Saxena, A.K. (2010). Activation of caspases and poly (ADP-ribose) polymerase cleavage to induce apoptosis in leukemia HL-60 cells by *Inula racemosa*. *Toxicology In Vitro*, 24(6), 1599-1609. [[CrossRef](#)]
21. Ajani, H.B., Patel, H.P., Shah, G.B., Acharya, S.R., Shah, S.K. (2009). Evaluation of antidiabetic effect of methanolic extract of *Inula racemosa* root in rats. *Pharmacologyonline*, 3, 118-129.
22. Ojha, S., Nandave, M., Kumari, S., Arya, D.S. (2010). Cardioprotection by *Inula racemosa* Hook in experimental model of myocardial ischemic reperfusion injury. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48, 918-924.
23. Guinoiseau, E., Luciani, A., Rossi, P.G., Quilichini, Y., Ternengo, S., Bradesi, P., Berti, L. (2010). Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 29(7), 873-879. [[CrossRef](#)]
24. Attard, E., Cuschieri, A. (2009). *In vitro* immunomodulatory activity of various extracts of Maltese plants from the Asteraceae family. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(6), 457-461.
25. Khan, A.L., Hussain, J., Hamayun, M., Gilani, S.A., Kim, Y.H., Rehman, S.U., Watanabe, K.N., Lee, I.J. (2010). Elemental allelopathy and antifungal activities of *Inula falconeri* from Himalaya Pakistan. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science*, 60(6), 552-559. [[CrossRef](#)]
26. 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.
27. Davis, P.H. (1975). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburgh University Press, Edinburgh.
28. Hürkul, M.M., Yayla, Ş. (2021). Leaf anatomy of *Quercus macranthera* subsp. *sypirensis* (K. Koch) Menitsky. *Biological Diversity and Conservation*, 14(3), 405-410. [[CrossRef](#)]
29. Metcalfe, C.R., Chalk, L. (1965). *Anatomy of Dicotyledones*, Clarendon Press, Oxford.



PREPARATION AND IN VITRO CHARACTERIZATION OF VANCOMYCIN LOADED PLGA NANOPARTICLES FOR THE TREATMENT OF ENTEROCOCCUS FAECALIS INFECTIONS

*ENTEROKOK ENFEKSİYONLARINDA KULLANILMAK ÜZERE VANCOMİSİN İÇEREN
PLGA NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU*

Gizem Rüya TOPAL^{1*} , Merve Eylül KIYMACI² , Yalçın ÖZKAN³ 

¹University of Health Sciences, Gulhane Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Biotechnology, 06018, Ankara, Turkey

²University of Health Sciences, Gulhane Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, 06018, Ankara, Turkey

³University of Health Sciences, Gulhane Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, 06018, Ankara, Turkey

ABSTRACT

Objective: *In this study, it was aimed to prepare Vancomycin loaded poly(lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles that can be used parenterally in enterococcal infections.*

Material and Method: *In the study, different concentrations of PLGA were used to prepare nanoparticles. Emulsification-solvent evaporation method was used in the preparation of the particles. Particle size and distribution, zeta potential, encapsulation efficiency and yield of the prepared formulations were determined. FTIR analyses were also performed for the formulations. The antibacterial activity was determined as a minimum inhibition concentration by broth microdilution method and as an inhibition zone by disk diffusion method against Enterococcus faecalis ATCC 29212 according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and its effectiveness on bacteria was interpreted by comparing with the pure active substance.*

Result and Discussion: *Particles were successfully prepared by emulsion-solvent evaporation method. Around 300 nm; Particles with a high amount of encapsulated Vancomycin were obtained at PDI values of 0.26-0.28. As a result of the FTIR analysis, it was determined that Vancomycin was loaded into the particle. The MIC values of the prepared PLGA nanoparticles against Enterococcus faecalis ATCC 29212 strain was found to be 4 µg/ml, and the inhibition zone diameters were measured as 15 mm, 15 mm and 16 mm, respectively.*

Keywords: *Antibacterial activity, Enterococcus faecalis, Nanoparticles, PLGA, Vancomycin*

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Gizem Rüya TOPAL
e-mail / e-posta: gizemruya.topal@sbu.edu.tr, **Phone / Tel.:** +03123046050

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada enterokok enfeksiyonlarında parenteral olarak kullanılacak Vankomisin yüklü poli(laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA) nanopartikülleri hazırlanması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, nanopartikülleri hazırlamak amacıyla farklı konsantrasyonlarda PLGA kullanılmıştır. Partiküllerin hazırlanmasında emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği, üretim verimi ölçülmüştür ve FTIR analizi yapılmıştır. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 suşu üzerine antibakteriyel aktivite sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile minimum inhibisyon konsantrasyonu olarak ve disk difüzyon yöntemi ile inhibisyon zonu olarak Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi standartlarına göre belirlenmiş, sonuçlar saf etken madde ile karşılaştırılarak yorumlanmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Partiküller emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi ile başarılı bir şekilde hazırlanmıştır. Yaklaşık 300 nm civarında; 0.26-0.28 PDI değerlerinde, enkapsüle olan Vankomisin miktarı oldukça yüksek partiküller elde edilmiştir. FTIR ve DSC analizi sonucu vankomisin partikül içine yüklendiği tespit edilmiştir. Hazırlanan PLGA nanopartiküllerin *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 suşu üzerine MİK değerleri 4 µg/ml bulunmuş, inhibisyon zon çapları ise sırasıyla 15 mm, 15 mm ve 16 mm olarak ölçülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Antibakteriyel aktivite, *Enterococcus faecalis*, Nanopartikül, PLGA, Vankomisin

INTRODUCTION

Enterococci are gram-positive cocci that take shape as singles, pairs, and short chains. The main medium of these bacteria is the gastrointestinal tract of humans and of animals. [1]. They are a common reason for urinary tract infections, bacteremia, and endocarditis and sometimes cause intra-abdominal infections and meningitis [2]. Enterococci have been among the important causes of hospital infections in recent years due to their resistance to environmental conditions, resistance to various antibiotics and their ability to develop new resistance [3]. Vancomycin is a glycopeptide antibiotic that is frequently used in the treatment of enterococci. Long-term and high-dosage regime causes the formation of resistant strains against Vancomycin and the patient is highly affected by side effects. It has been predicted that the use of nanoparticles with low Vancomycin concentration can be a solution to these problems in order to both reduce these side effects caused by Vancomycin and to prevent antibiotic resistance.

Nanoparticles are solid colloidal drug carrier systems prepared from natural or synthetic polymers, ceramic or inorganic elements, ranging in size from 1-1000 nm [4]. The therapeutically used polymeric nanoparticles contain synthetic biodegradable materials that can be converted into biocompatible polymers in the body and reabsorbed naturally [5]. The small size of the nanoparticles and the ability to be synthesized in the desired size are the main reason for their use as a drug delivery system. Besides, the ability to change the surface charge and modification properties of their surface provide many advantages to nanoparticles. Polymeric nanoparticles can enhance the efficacy of antibiotics in many cases with their brilliant advantages. The increased potency of antibiotics in nanoparticles are generally related to some physicochemical properties of particles like modified surface properties, low drug degradation, and enhanced drug absorption and uptake [6].

PLGA is one of the most used biodegradable polymers. It is approved by Food and Drug Administration (FDA) and European Medicine Agency (EMA) in many drug delivery systems for

human usage [7]. There have been several studies of antimicrobial loaded PLGA nanoparticles representing the improved pharmacological and pharmacokinetic behaviour in comparison to pure antimicrobials, so we planned to use this polymer in our formulation studies [8].

In this study, Vancomycin loaded PLGA nanoparticles were developed for the treatment of enterococcus infections. We aimed to use low concentrations of Vancomycin to reduce side effects, increase patient compliance and overcome the Vancomycin resistance instead of using a high dosage of Vancomycin for systemic effect. We searched the effect of PLGA amount on the formulations in terms of particle size and distribution, zeta potential, encapsulation efficiency. Then FTIR, DSC and drug release studies were also carried out. Finally, antimicrobial efficacy of nanoparticles was determined by minimum inhibition concentration and zone of inhibition studies.

MATERIAL AND METHOD

Materials

Vancomycin was kindly gifted from Koçak Pharma (Turkey). PLGA (Resomer® RG 504H), polyvinyl alcohol (PVA) and Acetonitrile (ACN) were purchased from Sigma Aldrich (Germany). All other chemicals and reagents were of analytical grade.

Preparation of Vancomycin loaded PLGA nanoparticles

PLGA nanoparticles were prepared by using emulsion-solvent evaporation method [9]. Briefly, different amounts of PLGA were dissolved in ACN. Vancomycin was added to PLGA solution directly and sonicated by probe sonicator (Sonopuls, Bandelin, Germany) for 30 s at 30% amplitude. The organic phase and aqueous phase (1% w/v PVA) were mixed by using homogeniser (IKA T-25 Ultra Turrax, Germany) at 6000 rpm for 5 min. This emulsion was magnetically stirred (Multistirrer15, Velp Scientific, Italy) at 400 rpm to evaporate ACN for over a night. Nanoparticles (NPs) were separated from the aqueous phase by centrifugation at 9000 rpm for 20 min (IEC Centra MP4R, USA) then washed with distilled water and freeze-dried (Christ, Gamma 2–20, USA). The composition of prepared nanoparticles is given in Table 1.

Table 1. Composition of Vancomycin loaded PLGA nanoparticles

Formulation Code	Amount of PLGA (mg)	Volume of ACN (mL)	Volume of %1 PVA (w/v) solution	Amount of Vancomycin (mg)
F1	60	2	10	10
F2	80	2	10	10
F3	100	2	10	10

Characterization of nanoparticles

Particle size and distribution

The particle size and polydispersity index (PDI) of nanoparticles were measured by photon correlation spectroscopy (PCS) (Nicomp Z3000, USA). The nanoparticle suspension was diluted at 1:200 with distilled water. Each sample was measured in triplicate [9].

Zeta potential

The zeta potential of nanoparticles was detected by laser doppler velocimetry (Nicomp Z3000, USA). The nanoparticle suspension was diluted at 1:50 with distilled water. Each sample was measured in triplicate [10].

Drug loading (DL) and encapsulation efficiency (EE)

The drug entrapped in the nanoparticles was determined by indirect method from the supernatant. Nanoparticles were separated from the aqueous phase by centrifugation at 9000 rpm for 20 min (Christ, Gamma 2–20, USA) then the amount of Vancomycin in supernatant was analyzed by UV spectroscopy in triplicate. The determination method of Vancomycin was validated according to International Council of Harmonization (ICH) Q2(R1) [11]. Linearity, accuracy, recovery, precision, specificity, detection, and quantification limits were detected in accordance with guideline. For Vancomycin, concentration range between 3.45 and 240 µg/mL the determination coefficient was found 0.999 for water and 0.9996 for PBS pH 7.4 which are really a high value. Detection and quantification limits were found 0.16 and 2.89 µg/mL for water and 1.91 and 4.64 µg/mL for PBS pH 7.4 respectively. For validation parameters, the relative standard deviation (RSD) values were found less than 2%. For specificity, all excipients that was used in formulation were checked at 280 nm and it was found that there is no spectrum. In the light of all these results, it can be said that the analytical method used for Vancomycin was validated and sensitive.

During the calculation of encapsulation and drug loading efficiency, the equations were used in below Equation 1 (Eq.1) and Equation 2 (Eq.2) respectively [12].

$$EE \text{ of Vancomycin } (\%) = \frac{\text{Amount of total drug} - \text{Amount of unloaded drug}}{\text{Amount of total drug}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\text{Drug loading efficiency } (\%) = \frac{\text{Amount of loaded drug}}{\text{Amount of total drug}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Production yield

Nanoparticles recovered after preparation were weighed and the production yield (%) was calculated according to Equation 3 (Eq.3) [13, 14].

$$\text{Production yield (\%)} = \frac{\text{Total nanoparticle amount after freeze drying (mg)}}{\text{Total solid material amount (vancomycin+polymer)(mg)}} \times 100 \text{ (Eq. 3)}$$

Drug release study

In vitro release of Vancomycin from the nanoparticles was evaluated by using the dialysis membrane method. Vancomycin release from the nanoparticles was evaluated in pH 7.4 phosphate buffer saline (PBS) at 37°C on a shaker at 50 rpm (Nuve, Turkey). Nanoparticles were placed in dialysis bags (12–14 kDa, Spectrum Labs, USA) and placed in 50 mL of PBS. At determined intervals, 2 mL samples were taken and the same amount of fresh buffer was added and the amount of Vancomycin was analyzed using UV spectroscopy at 280 nm.

Release kinetics were also evaluated using KinetDSTM software. Zero-order, first-order Hixson Crowell and Higuchi kinetics were applied and r^2 values were compared in order to determine the mechanism of drug release [15]. Moreover, the Korsmeyer–Peppas model has applied drug release behaviour analysis of nanoparticles to discriminate release mechanisms from polymeric systems [15, 16].

Fourier transform infra red spectroscopy (FTIR)

FTIR spectrums of Vancomycin, PLGA and the formulations were obtained by Spectrum400 spectrometer (Perkin Elmer, USA) to detect the chemical composition of materials. The spectra were recorded in the IR range from 600 to 4000 cm^{-1} .

Differential Scanning Calorimetry (DSC)

DSC (Perkin Elmer, USA) analysis was carried out at 25°C as initial and 300°C as final temperatures with temperature raise of 10°C/min in nitrogen atmosphere. DSC curves were evaluated by using Pyris software and glass transition temperatures (T_g) were determined.

Antibacterial activity studies

Antibacterial activity of the Vancomycin loaded PLGA nanoparticles was tested against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Antibacterial activity test was evaluated by broth microdilution method as a minimal inhibition concentration (MIC) and by disk diffusion method as an inhibition zone according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing standards [17]. In disk diffusion test, MHA plates with 4.0 ± 0.5 mm depth level were used. The bacterial suspension was prepared in 0,9% NaCl saline to the density of 0,5 McFarland turbidity by a densitometer from fresh culture of *E. faecalis* ATCC 29212. A sterile cotton swab was dipped into bacterial suspension and spreaded on the agar surface. Then the Vancomycin loaded PLGA nanoparticle discs were applied to the surface of the inoculated agar plates and incubated at $35 \pm 1^\circ\text{C}$ for 18 ± 2 h. After incubation, zone of inhibition around the test disks were measured and interpreted by comparison with the control. In broth microdilution test, a total of 100 μl cation adjusted MHB was added to

the all U-bottom microplate wells. The same volume of Vancomycin loaded PLGA nanoparticle solutions was added to the first well and diluted. Then the 1:100 dilution of *E. faecalis* ATCC 29212 suspension that was prepared in 0,9% NaCl saline from fresh *E. faecalis* ATCC 29212 culture to the density of a 0,5 McFarland turbidity was added to wells. The microplates were incubated at $35 \pm 1^\circ\text{C}$ for 18 ± 2 h. After incubation, minimal inhibition concentration was determined as the lowest concentration of a Vancomycin loaded PLGA nanoparticle solutions that inhibited the visible growth of *E. faecalis* ATCC 29212.

Statistical analysis

All data were expressed as mean \pm standard deviation. Student's t test was used to compare differences between groups. P values less than 0.05 were considered statistically significant. Each experiments and analyses were performed as 3 replicates.

RESULT AND DISCUSSION

Preparation of nanoparticles and particle size and polydispersity index

Vancomycin loaded PLGA nanoparticles were prepared successfully. Nanosized and monodispersed particles with a narrow range could be obtained using the emulsion-solvent evaporation technique. The formulation contains PVA in its outer phase, which is expected to reduce the migration of hydrophilic Vancomycin from the inner phase to the aqueous phase. This migration is undesirable as it reduces encapsulation efficiency. Therefore, PVA was used as a surfactant in the external phase [14, 18].

As it can be seen in Table 2, particle size and PDI grow as PLGA concentration increased from 60 mg to 100 mg slightly. Increasing polymer concentration can result to enhance the viscosity of the organic phase and formation of larger droplets in the emulsion. Besides, it may lead to disperse of drug-polymer solution into the aqueous phase slowly, so it caused to obtain bigger nanoparticles. This situation can be also responsible for the increase in the PI with increasing concentration of PLGA[19, 20]. This effect was also reported in the literature [21-23].

Table 2. Results of characterization studies for Vancomycin loaded PLGA nanoparticles (n=3)

Formulation code	Particle size (nm) \pm SD	PDI \pm SD	Zeta potential \pm SD (mV)	EE \pm SD (%)	DL \pm SD (%)	Production yield (%)
F1	267.3 \pm 2.66	0.238 \pm 0.04	-10.31 \pm 0.09	98.39 \pm 0.01	14.22 \pm 0.01	73.93
F2	301.4 \pm 3.6	0.268 \pm 0.03	-10.62 \pm 0.01	98.60 \pm 0.01	12.25 \pm 0.01	40.06
F3	312.5 \pm 1.85	0.284 \pm 0.07	-9.82 \pm 0.80	98.53 \pm 0.01	8.91 \pm 0.01	24.52

Zeta potential of nanoparticles

Zeta potential is related to the stability of nanoparticles [24]. The high zeta potential of the nanoparticles could decrease the interaction between particles because of the electrostatic repulsion, so the aggregation possibility of nanoparticles could reduce and it results in high stability [20]. Zeta potential of F1, F2 and F3 were found -10.31, -10.62 and -9.82 respectively (Table 2). For all formulations, the electrical charge was negative. It happened because of the ionized terminal carboxylic groups of PLGA that was on the surface of the particles [25]. A similar study carried out by Zakeri in 2013 was found similar zeta potential results for their particles [12].

Encapsulation efficiency

The encapsulation efficiencies of nanoparticles were found similar (Table 2). It was expected that EE values would be affected by different PLGA concentrations higher PLGA amount results in higher EE and many studies support this expectation, but in our study, different PLGA concentrations didn't affect the encapsulation efficiency [12, 25]. It was thought that difference in PLGA amount could be seen when the variation between PLGA concentrations was higher.

Production yield

The range of production yield for the particles was about 74%-25% (Table 2). According to the results, F1 formulation had the highest yield value and as PLGA concentration increased, yield values decreased. In different studies, researchers found opposite results [13, 14, 26]. Some studies indicated that it could be about the solubility of PLGA in organic solvent [27]. In F1 formulation, PLGA could be solved completely, it increased the yield of production.

Drug release study

The percentages of Vancomycin released from PLGA loaded particles are shown in Figure 1. The release study was carried out for 72h, but after 24h, the release profile didn't change for all formulations and free drug. The release of Vancomycin from nanoparticles was comparatively slow after 24h in comparison with free drug. In 6h, the free drug was completely released to the medium. Nearly, 43%, 30% and 25% of Vancomycin was released from particles F1, F2 and F3, respectively in 24h. It was thought that there was a strong interaction between Vancomycin and polymer due to opposite electric charges, so it led to slow the release profile of Vancomycin according to free form [8, 9]. Also, it can be seen from the release graph that when the amount of polymer was higher which also led to bigger particles, the Vancomycin release from particle was slower. The high concentration of PLGA may have increased the interaction with Vancomycin, resulting in the slower release. In the literature, it was explained that higher concentration of the active substance in nanoparticles generally resulted in faster release, and smaller amounts of the drugs in nanoparticles release in a more sustained manner [22]. Our results were compatible with the literature.

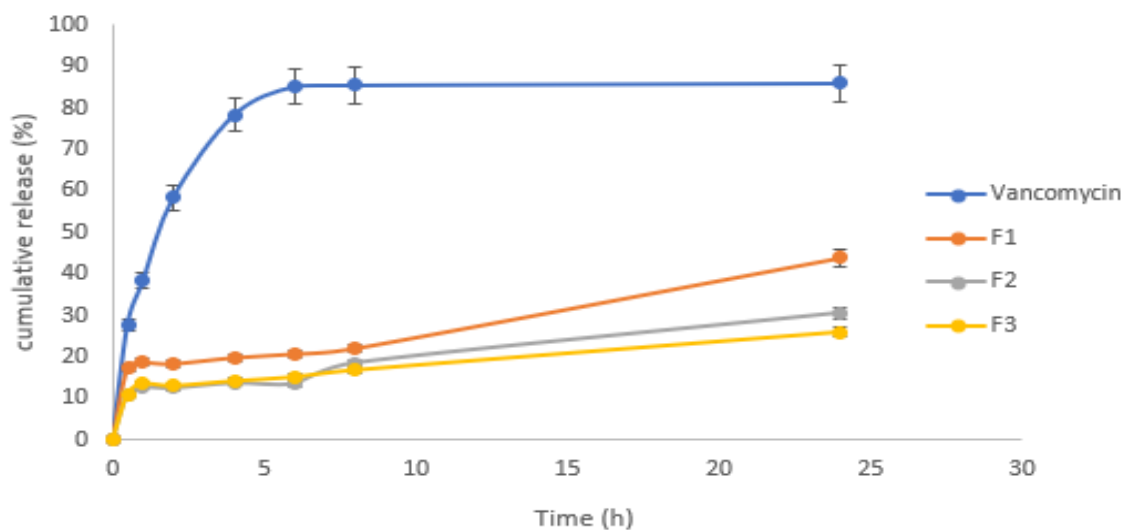


Figure 1. Release profile of Vancomycin, F1, F2 and F3

Drug release kinetics were analysed by plotting the cumulative release data to time by fitting to an exponential equation; zero-order kinetics, first-order kinetics, Hixson–Crowell's and Higuchi's equation and the r^2 values of these mathematical models were calculated. The r^2 values of zero-order kinetics, first order kinetics, Hixson–Crowell's and Higuchi's equation were found 0.9739; 0.9912; 0.9866; 0.1501 for F1; 0.9744; 0.9486; 0.9607; 0.1142 for F2 and 0.9817; 0.9434; 0.9605; 0.1625 for F3 respectively. According to the r^2 values, F2 and F3 coded formulations have been fitted with zero order and F3 has been fitted with first-order kinetic. To confirm the drug release mechanism from nanoparticles, the r^2 values were calculated by using Korsmeyer and Peppas Equation. According to equation, n is a value that indicating of the release mechanism. For spherical particles, the n values below 0.43 refer to for Fickian diffusion, values between 0.43 and 0.85 refer to anomalous non-Fickian transport, values between 0.85 and 1.00 refer to case II transport and values above 1.00 indicate super case-II transport mechanism [28]. For F1, n and r^2 values were found 1.97 and 0.6786; 2.29 and 0.7712 for F2 and 1.87 and 0.8435 for F3 respectively. All the n values for formulations were above 1.00 which was related to super case-II transport. It explains the release mechanism as swelling and polymer chain relaxation-controlled release.

Fourier transform infra red spectroscopy (FTIR)

FTIR spectrums of Vancomycin, polymer, and prepared nanoparticles were recorded on Spectrum 400 IR-spectrophotometer. FTIR spectra of Vancomycin showed major characteristics peaks at 3273 cm^{-1} related to COOH, 1650 cm^{-1} related to R-CO-NH₂, 1226 cm^{-1} phenolic OH, 1060 cm^{-1} R-O-R. PLGA showed characteristics peaks like C-H stretches at 2950 cm^{-1} , C=O at 1753 cm^{-1} , C-H bends at 1423 cm^{-1} and C-O stretches at 1168 cm^{-1} [29]. Vancomycin peaks were not seen in the spectra of particles, so the results confirmed that Vancomycin was totally dispersed in polymeric structure (Figure 2).

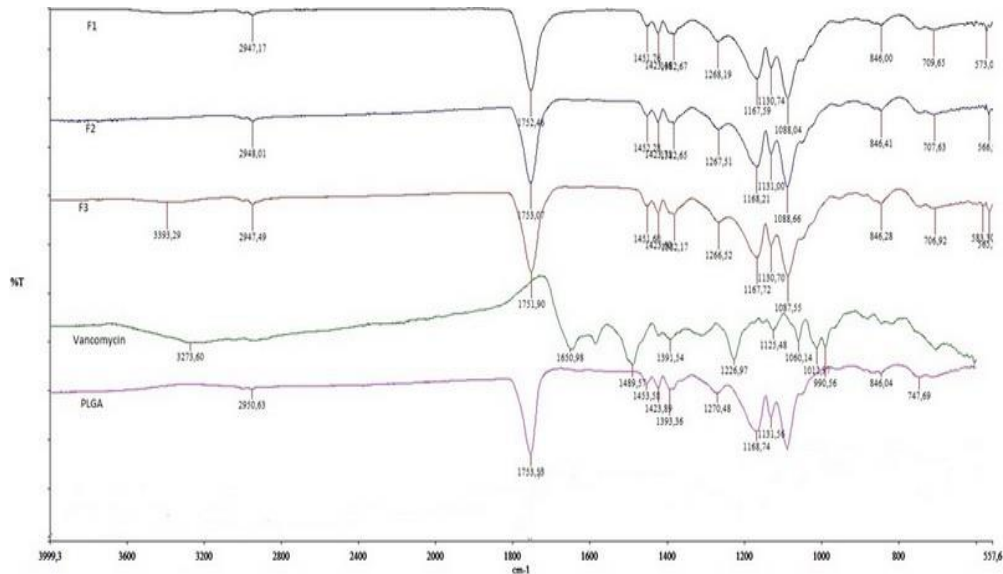


Figure 2. FTIR spectrums of formulations, Vancomycin, and PLGA

Differential Scanning Calorimetry (DSC)

When the DSC thermograms of Vancomycin, PLGA and formulations were examined, Vancomycin peak which was at 83.82° wasn't seen on the DSC thermogram of the formulations [30] (Figure 3). The results showed that the Vancomycin was turned to amorph form and be trapped in polymer matrix of formulation and homogeneously dispersed. The observed peak at formulations belongs to PLGA according to the pure PLGA results. The reason for the appearance of these peaks is that PLGA generates a layer covering the surface of the nanoparticle.

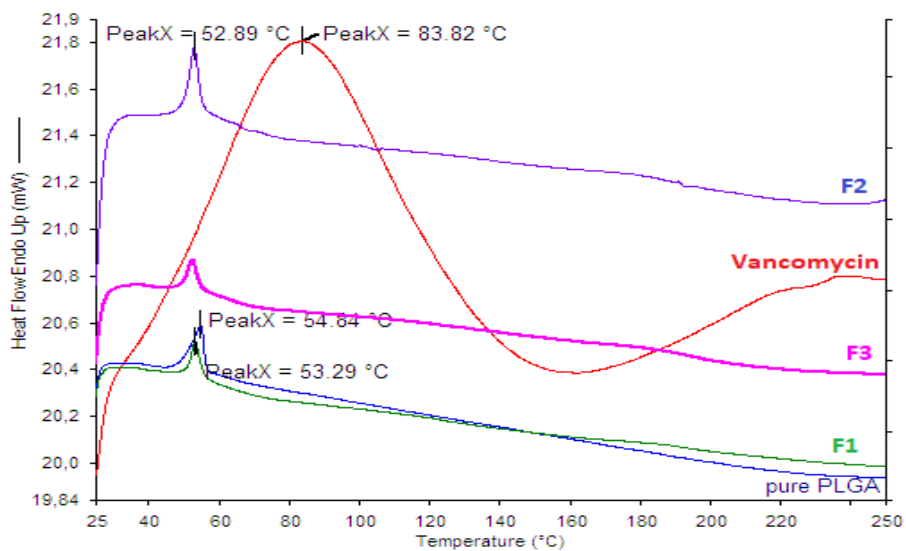


Figure 3. DSC thermogram of formulations, Vancomycin, and PLGA

Antimicrobial Efficacy Studies

Antibacterial activity of Vancomycin loaded PLGA NPs (60, 80, 100) were investigated by broth microdilution and disk diffusion method. According to same MIC results for all formulations and pure Vancomycin, it was determined that Vancomycin loaded PLGA NPs (60, 80, 90) did not show activity at lower concentrations compared with the pure active substance Vancomycin, so the MIC results did not change. The differences in the inhibition zones obtained from the disk diffusion study for F2 and F3 compared with free Vancomycin were not statistically significant ($p>0.05$), but for F1 the result was significant ($p<0.05$). The results were shown in Table 3. Vancomycin is a large molecule with a positive charge on its surface. Conversely, PLGA is a hydrophobic drug carrier with a negative charge on its surface, so PLGA and Vancomycin can make a strong interaction because of the electrostatic charge on their surfaces, hence the Vancomycin release from nanoparticles significantly reduces in vitro conditions and also, it can have an influence on antimicrobial effect. There are similar studies that have obtained this result [8, 31, 32]. That can be the reason for F2 and F3 formulations didn't show any changes in comparison with free form. For F1, according to disk diffusion results, there was an enhanced activity compared with free form, so because of this reason F1 can choose for next studies.

Table 3. Antibacterial activity results of Vancomycin loaded NPs against *E. faecalis* ATCC 29212.

Formulation code	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Zone diameters (mm)
F1	4	16
F2	4	15
F3	4	15
Vancomycin	4	14

In this study, our aim was to develop Vancomycin loaded PLGA nanoparticles to overcome the Vancomycin resistance because of the high and long dosage regime of antibiotics. Three formulations with different PLGA concentrations were prepared and particle size and distribution, zeta potential, encapsulation efficiency, production yield, drug release from particles FTIR and DSC analysis were carried out. The increasing changes of PLGA concentration led increasing particle size and PDI results for the prepared formulations. Zeta potential values were similar. The release of Vancomycin from particles was around 43%, 30% and 25% in 24 hours for F1, F2 and F3 respectively and in comparison with free Vancomycin, release was slower. According to the FTIR and DSC analyses, it can be said that Vancomycin was loaded into PLGA core for all the formulations. According to antimicrobial studies, MIC didn't change significantly compared with pure Vancomycin and inhibition zones of prepared formulations were very similar except F1. The similar antimicrobial effect of PLGA nanoparticles F2, F3 and pure Vancomycin in in-vitro condition is perhaps connected to the strong electrostatic

relationship between hydrophilic Vancomycin and relatively hydrophobic PLGA that results in the slow release of the antibiotic from nanoparticles. Besides, when the PLGA nanoparticles are applied in vivo, increased in vivo stability of Vancomycin and a faster release will be observed. In this case, an increased antimicrobial effect can be expected in-vivo, because of the increased concentration of Vancomycin at in-vivo. For F1, a faster release profile could have resulted in better antimicrobial activity.

The results demonstrated that the antibacterial activity of PLGA nanoparticles can enhance the in vivo activity of Vancomycin, so this formulation study could be a candidate for decreasing the dosage of Vancomycin for further studies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: G.R.T., M.E.K.; Design: G.R.T., M.E.K.; Control: G.R.T., M.E.K., Y.Ö.; Sources: G.R.T., M.E.K., Y.Ö.; Materials: G.R.T., M.E.K., Y.Ö.; Data Collection and/or processing: G.R.T., M.E.K.; Analysis and/or interpretation: G.R.T., M.E.K.; Literature review: G.R.T., M.E.K., Y.Ö.; Manuscript writing: G.R.T., M.E.K.; Critical review: G.R.T., M.E.K., Y.Ö.; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

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

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

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

REFERENCES

1. Yıldırım, M. (2007). Enterokoklar ve Enterokoklarla gelişen infeksiyonlar. *Duzce Medical Journal* , 9(2) , 46-52, from <https://dergipark.org.tr/en/pub/dtfd/issue/48260/610949> Retrieved April 08, 2022
2. Said, M.S., Tirthani, E., Lesho, E. (2021). Enterococcus Infections. In: StatPearls (Internet), from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567759/> Retrieved April 08, 2022. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
3. Tünger, Ö. (2012). Vankomisine dirençli enterokok infeksiyonlarının tedavisinde eski ve yeni tedavi seçenekleri. *ANKEM Dergisi*, 26(4), 215-227. [\[CrossRef\]](#)

4. Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R., Rudzinski, W.E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70(1), 1-20. [\[CrossRef\]](#)
5. Anderson, J.M., Shive, M.S. (1997). Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 28(1), 5-24. [\[CrossRef\]](#)
6. Valizadeh, H., Mohammadi, G.R., Ehyaei Milani, M., Azhdarzadeh, M., Zakeri-Milani, P., Lotfipour, F. (2012). Antibacterial activity of clarithromycin loaded PLGA nanoparticles. *Pharmazie*, 67, 63-68. [\[CrossRef\]](#)
7. Verderio, P., Bonetti, P., Colombo, M., Pandolfi, L., Prosperi, D. (2013). Intracellular drug release from curcumin-loaded PLGA nanoparticles induces G2/M block in breast cancer cells. *Biomacromolecules*, 14(3), 672-682. [\[CrossRef\]](#)
8. Lotfipour, F., Abdollahi, S., Jelvehgari, M., Valizadeh, H., Hassan, M., Milani, M. (2014). Study of antimicrobial effects of vancomycin loaded PLGA nanoparticles against enterococcus clinical isolates. *Drug Research (Stuttg)*, 64(7), 348-352. [\[CrossRef\]](#)
9. Anwer, M.K., Al-Mansoor, M.A., Jamil, S., Al-Shdefat, R., Ansari, M.N., Shakeel, F. (2016). Development and evaluation of PLGA polymer based nanoparticles of quercetin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 213-219. [\[CrossRef\]](#)
10. Esim, O., Bakirhan, N.K., Sarper, M., Savaser, A., Ozkan, S.A., Ozkan, Y. (2020). Influence of emulsifiers on the formation and in vitro anticancer activity of epirubicin loaded PLGA nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 60, 102027. [\[CrossRef\]](#)
11. International Council of Harmonization (ICH) Web Site. (2001). Retrieved March 14, 2021, from <https://www.ich.org/>
12. Zakeri-Milani, P., Loveymi, B.D., Jelvehgari, M., Valizadeh, H. (2013). The characteristics and improved intestinal permeability of vancomycin PLGA-nanoparticles as colloidal drug delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, 174-181. [\[CrossRef\]](#)
13. Topal, G.R., Devrim, B., Eryilmaz, M., Bozkir, A. (2018). Design of ciprofloxacin-loaded nano- and microcomposite particles for dry powder inhaler formulations: Preparation, in vitro characterisation, and antimicrobial efficacy. *Journal of Microencapsulation*, 35(6), 533-547. [\[CrossRef\]](#)
14. Simon, A., Moreira, M.L.A., Costa, I.F., de Sousa, V.P., Rodrigues, C.R., e Lima, L.M.T.R., Sisnande, T., do Carmo, F.A., Leal, I.C.R., dos Santos, K.R.N., da Silva, L.C.R.P., Cabral, L.M. (2020). Vancomycin-loaded nanoparticles against vancomycin intermediate and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Nanotechnology*, 31(37), 375101. [\[CrossRef\]](#)
15. Mendyk, A., Jachowicz, R., Fijorek, K., Dorozynski, P., Kulinowski, P., Polak, S. (2012). KinetDS: An open source software for dissolution test data analysis. *Dissolution Technologies*, 19(1), 6-11. [\[CrossRef\]](#)
16. Costa, P., Sousa Lobo, J.M. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 123-133. [\[CrossRef\]](#)





17. EUCAST Web site. (2021). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. From https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0_Breakpoint_Tables.pdf/ Accessed date: 09.12.2021.
18. Tewes, F., Munnier, E., Antoon, B., Ngaboni Okassa, L., Cohen-Jonathan, S., Marchais, H., Douziech-Eyrolles, L., Soucé, M., Dubois, P., Chourpa, I. (2007). Comparative study of doxorubicin-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 66(3), 488-492. [\[CrossRef\]](#)
19. Sabaeifard, P., Abdi-Ali, A., Soudi, M.R., Gamazo, C., Irache, J.M. (2016). Amikacin loaded PLGA nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93, 392-398. [\[CrossRef\]](#)
20. Seju, U., Kumar, A., Sawant, K.K. (2011). Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: In vitro and in vivo studies. *Acta Biomaterialia*, 7(12), 4169-4176. [\[CrossRef\]](#)
21. Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., Allémann, E., Doelker, E. (1996). Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly (d,l-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics*, 143(2), 133-141. [\[CrossRef\]](#)
22. Mainardes, R.M., Evangelista, R.C. (2005). PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. *International Journal of Pharmaceutics*, 290(1), 137-144. [\[CrossRef\]](#)
23. Song, X., Zhao, Y., Hou, S., Xu, F., Zhao, R., He, J. (2008). Dual agents loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(2), 445-453. [\[CrossRef\]](#)
24. Bacanlı, M., Eşim, Ö., Erdoğan, H., Sarper, M., Erdem, O., Özkan, Y. (2021). Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles in neuroblastoma cells. *Food and Chemical Toxicology*, 154, 112323. [\[CrossRef\]](#)
25. Tefas, L.R., Tomuță, I., Achim, M., Vlase, L. (2015). Development and optimization of quercetin-loaded PLGA nanoparticles by experimental design. *Clujul Medical*, 88(2), 214-223. [\[CrossRef\]](#)
26. Elsewedy, H.S., Dhubiab, B.E.A., Mahdy, M.A., Elnahas, H.M. (2020). Development, optimization, and evaluation of PEGylated brucine-loaded PLGA nanoparticles. *Drug Delivery*, 27(1), 1134-1146. [\[CrossRef\]](#)
27. Murakami, H., Kobayashi, M., Takeuchi, H., Kawashima, Y. (1999). Preparation of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *International Journal of Pharmaceutics*, 187(2), 143-52. [\[CrossRef\]](#)
28. Seedat, N., Kalhapure, R.S., Mocktar, C., Vepuri, S., Jadhav, M., Soliman, M., Govender, T. (2016). Co-encapsulation of multi-lipids and polymers enhances the performance of vancomycin in lipid-polymer hybrid nanoparticles: In vitro and in silico studies. *Materials Science and Engineering: C*, 61, 616-630. [\[CrossRef\]](#)
29. Singh, G., Kaur, T., Kaur, R., Kaur, A. (2014). Recent biomedical applications and patents on biodegradable polymer-PLGA. *International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical*

- Sciences*, 1, 30-42, from https://www.researchgate.net/profile/Gurpreet-Singh-88/publication/269808442_Recent_biomedical_applications_and_patents_on_biodegradable_polymer-PLGA/links/54ad7a04cf24aca1c6f5bcd/Recent-biomedical-applications-and-patents-on-biodegradable-polymer-PLGA.pdf Retrieved December 9, 2021.
30. Sunanda Laxmi, P., Vidyavathi, M., Venkata, S.K.R. (2021). DoE approach for development of localized controlled release microspheres of Vancomycin for treatment of septic arthritis. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(1), 235. [CrossRef]
 31. Alonso, M.J., Losa, C., Calvo, P., Vila-Jato, J.L. (1991). Approaches to improve the association of amikacin sulphate to poly (alkylcyanoacrylate) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 68(1), 69-76. [CrossRef]
 32. Abeylath, S.C., Turos, E., Dickey, S., Lim, D.V. (2008). Glyconanobiotics: Novel carbohydrate nanoparticle antibiotics for MRSA and Bacillus anthracis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(5), 2412-2418. [CrossRef]



EVALUATION OF EDUCATIONAL NEEDS OF DIABETIC PATIENTS

DİYABETİK HASTALARIN EĞİTİM İHTİYAÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Nilay AKSOY^{1*} , Nur OZTURK¹ , Serel ULUSOY¹ , Rashida Muhammad UMAR² ,
Sena ÖZAYDIN¹ 

¹Altınbaş University, Faculty of Pharmacy, Department of Clinical Pharmacy, 34217, Istanbul, Turkey

²Medipol University, Faculty of Pharmacy, Department of Clinical Pharmacy, 34815, Istanbul, Turkey

ABSTRACT

Objective: *Our study aimed to assess the role of pre-graduate pharmacy students' participation in a diabetic education program on improving diabetic self-care.*

Material and Method: *This study included both a cross-sectional and a longitudinal follow-up. Altınbaş University fifth-year pharmacy students gathered relevant information from diabetic patients that visited community pharmacies, under the supervision of their instructor pharmacist. The participants filled out the diabetic self-care scale on their first visit before they were given the education. Patients refilled the same self-care questionnaire after three months. Statistical package for the social science (SPSS) 26 was used for all statistical analysis.*

Result and Discussion: *The study comprised 86 diabetic patients. The second questionnaire results showed significant improvement in all patients. The total diabetic self-care scale scores were improved remarkably after the training session. HbA1c and BMI values decreased significantly. An educational program can improve diabetic self-care and diabetic outcomes. Active participation of final year pharmacy students in patient care can also improve pharmacists' participation and contribution to patient care delivery.*

Keywords: *Diabetes, self-care, patient education, clinical pharmacist, quality of life*

ÖZ

Amaç: *Çalışmamız, son sınıf eczacılık öğrencilerinin diyabetik bir eğitim programına katılımlarının diyabetik öz bakımın iyileştirilmesindeki rolünü değerlendirmeyi amaçlamıştır.*

Gereç ve Yöntem: *Bu çalışma hem kesitsel hem de boylamsal bir takip içermektedir. Altınbaş Üniversitesi eczacılık beşinci sınıf öğrencileri, serbest eczaneleri ziyaret eden diyabet hastalarının gerekli bilgilerini sorumlu eczacılarının gözetiminde topladı. Katılımcılar diyabetik öz bakım ölçeğini doldurduktan sonra kendilerine eğitim verildi. Hastalar aynı öz bakım anketini üç ay sonra tekrar doldurdu. Tüm istatistiksel analizler için sosyal bilimler için istatistiksel paket (SPSS) 26 kullanıldı.*

Sonuç ve Tartışma: *Çalışmaya 86 diyabetik hasta dahil edildi. İkinci anket sonuçları tüm hastalarda anlamlı iyileşme gösterdi. Toplam diyabetik öz bakım ölçeği puanları, eğitim seansından sonra önemli ölçüde*

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Nilay Aksoy
e-mail / e-posta: nilay.aksoy@altinbas.edu.tr, **Phone / Tel.:** +902127094528

iyileşti. HbA1c ve BMI değerlerinde anlamlı azalma oldu. Bir eğitim programı diyabetik öz bakımı ve diyabetik sonuçları iyileştirebilir. Eczacılık son sınıf öğrencilerinin hasta bakımına aktif katılımı, eczacıların hasta bakımı sunumuna katılımını ve katkısını da artırabilir.

Anahtar Kelimeler: *Diyabet, öz bakım, hasta eğitimi, klinik eczacı, yaşam kalitesi*

INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is a prevalent term for a bunch of metabolic disorders, most of which include incessant hyperglycemia. Diabetes results from impaired insulin secretion and/or insulin efficacy [1]. Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM) develops from the inability of the pancreas to produce and secrete endogenous insulin. Although T1DM can be seen at all ages, it is more prevalent in people under 30 years of age. It accounts for the highest incidence of childhood chronic diseases (14.8/100,000) [2]. External factors have recently been associated with the pathogenesis of T1DM as causes and potentiators of beta cells degradation. These factors are, but not limited to, intestinal microbiota, viral infections, vaccination, cow's milk consumption, vitamin D deficiency, polyunsaturated fatty acids, glycemic index, toxins and chemicals [3-7]. Type 2 Diabetes mellitus (T2DM) was formerly referred to as either non-insulin-dependent diabetes or adult-induced diabetes. People with T2DM comprise approximately 90-95% of all diabetic patients. Individuals with T2DM have a relative insulin deficit in addition to insulin receptor resistance [8]. Gestational diabetes mellitus (GDM) presents during pregnancy. Around %1-2 of all pregnant women develop elevated glucose intolerance during pregnancy that, in most cases, returns to normal postpartum [9]. Advanced maternal age, weight, ethnic origin, T2DM family history and a preceding GDM history are known risk factors. GDM may lead to macroscopic babies, poor pregnancy outcomes, glycosuria, and polyhydramnios during pregnancy [10].

Learning to cope with the multifaceted nature of diabetes in a social environment has been defined as an evolutionary process of information or consciousness growth in diabetes self-care [11-12]. Healthy lifestyle including healthy diet, physical activity, blood sugar monitoring, medication compliance, good problem-solving skills, healthy coping skills, and risk-reduction behaviors are the seven dimensions of diabetic self-care [13-14]. The patient's strong and persistent compliance is required for effective diabetes control and failure to follow self-care directives is often the main contributor to diabetic complications. Non-compliance is caused by lack of self-discipline, absence of support from family members and/or physicians, poverty, and shortage of health facilities. According to the American Public Health Association, more than 75% of individuals with chronic diseases should take an active or critical role in self-care. Several studies have showed low compliance to self-care activities, which include medication usage, insulin injection, and urine and blood sugar tests, among diabetic patients. Diabetic patients need an effective and continuous program to help prevent complications, ensure metabolic control, maintain and monitor their quality of life. Education in diabetes is vital. Education should cover all the information, attitude, and skill necessary for the patient and family to facilitate maintenance

and monitoring [15]. Self-management education has been shown to effectively increase patient outcomes in terms of attaining and maintaining lower glycosylated hemoglobin levels [16].

Increasing diabetes awareness provides benefits for the patients and physicians. Firstly, it reduces the workload of healthcare professionals as patients readily understand their problems and take action accordingly. Diabetes education increases patients' quality of life. It can improve self-monitoring, treatment, and metabolic control. It also enables the prevention and early diagnosis of acute and chronic complications and decreases the cost of diabetes care[17]. The diabetes educator is an essential member of the multidisciplinary diabetes treatment team[18]. This study aims to assess the role of pre-graduate pharmacy students' participation in a diabetic education program and improving diabetic self-care.

MATERIAL AND METHOD

Study Design

This cross-sectional and longitudinal follow-up study was carried out during the clinical pharmacy internship. Twenty-five pharmacy students in their fifth year, from Altınbaş University's School of Pharmacy, started their internships in 25 different community pharmacies in Bakırköy, Istanbul for 10 weeks from September to December 2020. During these ten weeks, the students collected data and participated in educational activities. Data including demographic and socioeconomic profiles, clinical characteristics, diabetes treatment, and associated comorbidities, laboratory results, weight, height were collected from volunteers using a pre-prepared form. Students were able to maintain the previous demographic variables under the supervision of the pharmacists that run these pharmacies and collaborate in this project. The validated Turkish version of the diabetic self-care scale was used to assess diabetic self-care in volunteers. The diabetic self-care scale, a Likert-type scale with 35 items, developed by Lee and Fisher in 2005 was validated by Karakurt and Kasikci in 2015 [19-20]. The validated Turkish scale is a 4point Likert scale while the original is a 6 point Likert scale. The response options were changed to “Never (1)” “Sometimes (2)” “Frequently (3)”, and “Always (4)”. Participants filled out the questionnaire before they were educated by the students under the supervision of a pharmacist. The educational materials included previously prepared and verified brochures and rubrics. These brochures and rubrics were created by Altınbaş University's clinical pharmacy department. It was double-checked for its content and tested for readability using the Flesch Reading Ease test. This all-inclusive education emphasized healthy lifestyle changes, self-care, personal hygiene, foot hygiene, and active participation in disease prevention and treatment. Three months after the education, the patients were asked to complete the diabetic self-care scale again, and their laboratory tests and weight were re-analyzed. The differences in response to diabetic self-scale before and after education as well as the changes in Body Mass Index (BMI) and HbA1C values were analyzed.

Patient Consent and Ethics Approval Forms

The patient permission form was taken before participation in the study, which was approved by the Altinbas University Ethics Committee (date 27.11.2019 / No 1008).

Statistical Analysis

SPSS version 26 was used to analyze the data. Unless otherwise noted, all data are provided as mean + SEM. The results with $p < 0.05$ in the 95% confidence interval were considered significant.

RESULT AND DISCUSSION

Demographic and Clinical Characteristics

The study included 86 diabetic patients who agreed to participate in the study. The demographic data of the patients are shown in Table 1.

Table 1. Demographic and clinical characteristics

Demographic values N= (86)	N	%
Age (Mean±SD/Median)	57.45 ± 12.5/58	
25%	49.75	
75%	65	
Gender		
Female	46	53.49
Male	40	46.5
Educational Status		
No formal education	5	5.8
Primary school	33	38.4
Middle school	23	26.7
High school	16	18.6
University graduate	9	10.5
Marital Status		
Married	71	82.6
Single	15	17.4
Economic Status		
Low income	7	8.1
Middle income	66	76.7
High income	10	11.6
Smoking status		
Non-smoker	66	76.7
Smoker	20	23.3
Alcohol use status		
Non-consumer	82	95.3
Consumer	4	4.7

Table 1 (continued). Demographic and clinical characteristics

Diabetes Mellitus type		
T1 DM	33	38,4
T2 DM	53	61,6
Presence and number of comorbidities		
No comorbidity	32	37,2
1-2 comorbidities	43	50
3+ comorbidities	11	13

Most participants (53.49 %) were female, with a mean age of 58 years. Most patients (61.6 %) had type 2 diabetes mellitus. Most participants had at least elementary school education with only 10.5% of participants having a university degree.

The Diabetes Self-Care Scale Scores, BMI and HbA1c

The total mean and SD of the pre and post-test scores were found to be 85.77 ± 21.88 , 108.44 ± 7.451 respectively ($p < 0.001$) (Table 2). The mean post-test scores following the training sessions in the study were found to be significantly higher than the pre-test scores for all the questions with a $p < 0.001$ in a majority of them.

Table 2. Analysis of the diabetes self-care scale scores before and after the training session

Diabetes self-care scale (N=86)	Pre mean \pm SD	Post mean \pm SD	p-value
- Diet-related questions 1. I eat my meals at the same time every day. 2. I always eat my snacks. 3. I stay on my diet when I eat at restaurants. 4. I stay on my diet when I go to parties. 5. I stay on my diet when people around me do not know that I have diabetes. 6. I do not overeat.	14.98 \pm 4.47	17.88 \pm 2.7	$p < 0.0001^*$
- Exercise-related questions 7. I exercise regularly. 8. I exercise even when I do not feel like exercising. 9. I get enough exercise.	5.01 \pm 2.39	6.14 \pm 2.08	$p = 0.003^*$
- Blood glucose testing-related questions 10. I test my blood sugar. 11. I keep a log of my blood sugar results.	5.34 \pm 1.84	5.97 \pm 1.53	$p = 0.015^*$
- Medication adherence-related questions 12. I take my diabetes pills as ordered. 13. I take my insulin shots as ordered. 14. I adjust my insulin dosage according to my blood sugar results.	9.05 \pm 2.27	10.63 \pm 1.12	$p < 0.0001^*$

Table 2 (continued). Analysis of the diabetes self-care scale scores before and after the training session

- Hypoglycemic control-related questions 15. I carry candy or sugar tablets when I am away from home. 16. I take candy or sugar tablets when my blood sugar is low.	5.08 ± 2.12	6.58 ± 1.40	$p < 0.0001^*$
- Physician visits-related questions 17. I see my doctor on a regular basis. 18. I consult my doctor when my blood sugar is too high. 19. I consult my doctor when my blood sugar is too low.	8.43 ± 2.59	8.53 ± 1.09	$p = 0.743$
- Foot care and personal hygiene-related questions 20. I regularly examine my feet. 21. I always wear shoes outside. 22. I always wear shoes inside during the day. 23. I regularly wear socks. 24. I keep my toenails trimmed. 25. I bathe regularly. 26. I brush my teeth every day.	21.38 ± 5.79	27.16 ± 1.12	$p < 0.0001^*$
- Diabetes and its complications awareness-related questions 27. I wear diabetes identification. 28. I talk with other people that have diabetes about how they care for themselves. 29. I ask healthcare provider(s) about how to prevent complications. 30. I read information on diabetes when it is given to me. 31. I go to the library to find information on diabetes. 32. I attend a diabetes support group. 33. I subscribe to a diabetes magazine. 34. I search the Internet to find information on diabetes. 35. I use what I have learned to prevent complications.	16.50 ± 7.21	25.45 ± 3.53	$p < 0.0001^*$
Total score	85,77 ± 21,88	108,44 ± 7,451	$p < 0.0001^*$

The BMI and HbA1c values at baseline and after three months were obtained from only 30 patients. At three months, there was a significant decrease in the mean BMI and HbA1c values ($p < 0.05$) (Table 3).

Self-care is a developmental process of knowledge or awareness established by patients. They learn to cope with the complex nature of their disease in a social setting. The diabetic self-care scale has been validated in Turkey and it is appropriate for measuring all these dimensions. By actively participating in their treatment, diabetic patients can have a significant effect on the progression and development of their illness. However, especially with long-term improvements, adherence or

compliance to these activities is usually low [21]. Lack of adequate knowledge, economic challenges and inadequate access to health facilities are factors that have been shown to lead to poor self-care [22]. During this study, participants were educated on all these aspects of diabetic self-care. We found this method to be effective in improving patients' outcomes as all patients showed significant improvements in their eating habits and adhered more to their diets. Diet is one of the most challenging areas for diabetic self-care, according to Nagelkerk and his colleagues [23]. According to the findings of a study conducted in Saudi Arabia [24], more than half of diabetic patients denied altering their eating habits, which is indicative of the difficulty in adhering to dietary restrictions. Although a cluster-randomized trial concluded that patient education did not affect diabetic patients' motivation or awareness [25]. Many other studies supported our finding that patient education can improve diet behaviors in diabetic patients.

Table 3. Changes in the BMI and HbA1c values at baseline and three months

N=30	Pre-training session		Post-training session		p-value
	Mean ± SD	Median	Mean ± SD	Median	
BMI	32 ±4.48	31.75 (28-35.87)	30.88 ± 5.55	31.25 (26.12-34)	p<0.05
HbA1c	10.89± 1.82	11 (9.12-12.5)	10.27±11.14	9 (7-9)	p<0.05

Similar improvements were detected in exercise habits, with significant changes perceived post-education patient reports. Generally, physical activity in diabetics is exceptionally low and is influenced by a variety of psychological and social factors [16]. Furthermore, Asa et al. and Cugusi et al. explored the impact of an aquatic exercise intervention on individuals with type 2 diabetes and discovered that exercise improved their quality of life significantly [25-26]. Also, Myers et al. found that exercise programs, independent of training style, improved physical health quality of life in patients with type 2 diabetes (aerobic, resistance, or combined). In the Saudi Arabia study, 50% of the patients denied modifying their exercise habits. Our students were able to provide a comprehensive education focused on prioritizing and making time for exercise, and reducing exercise-induced injury, allowing them to address any concerns or worries that may have prevented the patient from exercising altogether.

Continuous monitoring of blood glucose levels is essential to establish a better diabetic outcome. Blood glucose monitoring improved significantly in our study patients. Whitley et al. found that more frequent blood glucose tests were reported by %59 of the participants in their research after the participants were educated, with a significant difference given $p<0.05$ [27].

Our data disclose a significant increase in the patient's compliance with their medications following the education sessions. These findings are also in line with another study conducted by Erku et al., which found pharmacist interventions significantly improved medication compliance [28]. According to another comprehensive analysis of randomized clinical research, five out of six studies that examined tailored pharmacist interventions showed that patient education considerably increased medication compliance by 7% to 27%.

Our education improved our patients' knowledge of their disease and its complications and their abilities to cope with some problems, such as dealing with hypoglycemic crisis and improved their communication with their physicians. They are more aware of how to differentiate self-manageable complications and serious ones. This improvement means that they were starting to develop good problem-solving skills, healthy coping mechanisms, and risk-reduction behaviors.

During the educational sessions, foot care and personal hygiene were also emphasized. Daily foot inspection, professional treatment, hygiene, and suitable shoe gear are all helpful in reducing the incidence of foot issues. According to McCook-Martinez et al., proper foot care education helps to prevent disease-related morbidity, hospitalization, and amputation [28]. In a research that included lower limb screening and treatment regimens for at-risk patients, Lavery et al. discovered a reduction in hospitalizations and amputations [29]. In our study, we did not measure the effect of foot management objectively; however, the subjective data that we obtained through the self-care questionnaire suggests positive outcomes.

Unfortunately, objective data was confined to BMI and HbA1C results obtained from only 30 patients. Nevertheless, the changes in BMI and HbA1C were significant at three months. These changes could be because of the improvement in self-care dimensions, especially diet and exercise. After a 3-month trial with diabetic patients, KaracaSivrikaya discovered a substantial drop in the patients' HbA1c value, while Ersoy et al. also identified a significant decrease in the patients' HbA1c value after a 6-month follow-up [30-31]. After one year of education, the HbA1c value of patients with type 2 diabetes dropped, according to a research done in Germany [32]. Najafipour et al. concluded that long-term exercise programs had a significant effect on HbA1C [33]. In contrast to prior research that indicated beneficial decreases in HbA1C levels, Duke and his colleagues discovered that diabetes self-management education had no meaningful effect on HbA1c in African Americans [34]. According to another research, individual patient education did not significantly improve HbA1c in six studies comparing it to standard therapy [35].

The small sample size for the patients who provided their laboratory results was one of our main limitations; the follow-up data collection began during the first months of the pandemic, which made it more difficult to reach many of our patients; and laboratory tests were provided only by patients who

had such results on their first pharmacy visit. Another limitation of our study is that we did not obtain enough information about how long the patients had been diagnosed with diabetes, so we were unable to demonstrate the relationship between diagnosis time and self-care skill scores. Regardless, our study is still valuable not only because it demonstrates a significant improvement in diabetic self-care through education, but also because it was delivered by pre-graduate pharmacy students, who were able to prove themselves as valuable human resources for future education programs.

A comprehensive program that covers all aspects of self-care and addresses all the worries and concerns of diabetic patients can improve diabetic self-care and diabetic outcomes. Although a variety of demographic, socioeconomic, and social support characteristics have been identified as positive enhancers of diabetic patient self-care activities, the role of doctors in encouraging self-care is critical and cannot be overstated. Pre-graduate students under the supervision of a registered pharmacist are an excellent human resource, who when appropriately trained, can contribute to clinical pharmacy practices in community pharmacies and hospitals.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: *N.A., N.O, S.Ö, S.U, R.O .;* Design: *N.A., N.O, S.Ö, S.U, R.O;* Control: *N.A., N.O, S.U, R.O;* Sources: *N.A., N.O, S.Ö, S.U, R.O.;* Materials: *N.A., N.O, S.U.;* Data Collection and/or processing: *N.A., N.O, S.Ö.;* Analysis and/or interpretation: *N.A., N.O, S.U.;* Literature review: *N.A., N.O, S.Ö, R.O.;* Manuscript writing: *N.A., N.O, S.U.;* Critical review: *N.A., N.O, S.Ö, S.U, R.O.;* Other: -

CONFLICT OF INTEREST

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

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

The patient permission form was taken before participation in the study, which was approved by the Altinbas University Ethics Committee (date 27.11.2019 / No 1008).

REFERENCES

1. Boldison, J., Wong, F.S. (2016). Immune and pancreatic β cell interactions in type 1 diabetes. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 27(12), 856-867. [\[CrossRef\]](#)

2. Lamb, M.M., Miller, M., Seifert, J.A., Frederiksen, B., Kroehl, M., Rewers, M., Norris, J.M. (2015). The effect of childhood cow's milk intake and HLA-DR genotype on risk of islet autoimmunity and type 1 diabetes: The diabetes autoimmunity study in the young. *Pediatric Diabetes*, 16(1), 31-38. [\[CrossRef\]](#)
3. Esposito, S., Toni, G., Tascini, G., Santi, E., Berlioli, M.G., Principi, N. (2019). Environmental factors associated with type 1 diabetes. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 592. [\[CrossRef\]](#)
4. Rewers, M., Ludvigsson, J. (2016). Environmental risk factors for type 1 diabetes. *Lancet*, 387(10035), 2340-2348. [\[CrossRef\]](#)
5. Ortega-Senovilla, H., Schaefer-Graf, U., Herrera, E. (2020). Pregnant women with gestational diabetes and with well controlled glucose levels have decreased concentrations of individual fatty acids in maternal and cord serum. *Diabetologia*, 63(4), 864-874. [\[CrossRef\]](#)
6. Paun, A., Yau, C., Danska, J.S. (2017). The influence of the microbiome on type 1 diabetes. *The Journal of Immunology*, 198(2), 590-595. [\[CrossRef\]](#)
7. Yoon, J.W., Austin, M., Onodera, T., Notkins, A.L. (1979). Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *New England Journal of Medicine*, 300(21), 1173-1179. [\[CrossRef\]](#)
8. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*, 41(Suppl 1): S13-S27. [\[CrossRef\]](#)
9. Plows, J.F., Stanley, J.L., Baker, P.N., Reynolds, C.M., Vickers, M.H. (2018). The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3342. [\[CrossRef\]](#)
10. Giannakou, K., Evangelou, E., Yiallourous, P., Christophi, C.A., Middleton, N., Papatheodorou, E., Papatheodorou, S.I. (2019). Risk factors for gestational diabetes: An umbrella review of meta-analyses of observational studies. *PloS One*, 14(4), e0215372. [\[CrossRef\]](#)
11. Ndjaboue, R., Dansokho, S.C., Boudreault, B., Tremblay, M.C., Dogba, M.J., Price, R., Delgado, P., McComber, A.M., Drescher, O., McGavock, J., Witteman, H. (2020). Patients' perspectives on how to improve diabetes care and self-management: Qualitative study. *British Medical Journal Open*, 10(4), e032762. [\[CrossRef\]](#)
12. Paterson, B., Thorne, S. (2000). Developmental evolution of expertise in diabetes self-management. *Clinical Nursing Research*, 9(4), 402-419. [\[CrossRef\]](#)
13. Shrivastava, S.R., Shrivastava, P.S., Ramasamy, J. (2013). Role of self-care in management of diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Metabolic Disorders*, 12, 14. [\[CrossRef\]](#)
14. Association of Diabetes Care and Education Specialists. 7 Self-care Behaviors; 2019. From <https://www.diabeteseducator.org/practice/practice-tools/app-resources/the-aade7-self-care-behaviors-the-framework-for-optimal-self-management>. Retrieved April 13, 2022.
15. Bayrak, G., Colak, R. (2012). Patient education in treatment of diabetes. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 29(s1), 7-11. [\[CrossRef\]](#)

16. Chvala, C.A., Sherr, D., Lipman, R.D. (2016). Diabetes self-management education for adults with type 2 diabetes mellitus: A systematic review of the effect on glycemic control. *Patient Education and Counseling*, 99(6), 926-943. [\[CrossRef\]](#)
17. Świątoniowska, N., Sarzyńska, K., Szymańska-Chabowska, A., Jankowska-Polańska, B. (2019). The role of education in type 2 diabetes treatment. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 151, 237-246. [\[CrossRef\]](#)
18. McGill, M., Blonde, L., Chan, J.C., Khunti, K., Lavalle, F.J., Bailey, C.J. (2017). The interdisciplinary team in type 2 diabetes management: Challenges and best practice solutions from real-world scenarios. *Journal of Clinical & Translational Endocrinology*, 7, 21-27. [\[CrossRef\]](#)
19. Lee, N.P., Fisher, W.P.Jr. (2005). Evaluation of the diabetes self-care scale. *Journal of Applied Measurement*, 6(4), 366-381. [\[CrossRef\]](#)
20. Karakurt, P., Kasikci, M. (2015). Validity and reliability of the Turkish version of the Diabetes Self-Care Scale. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*, 35(S2),148-156. [\[CrossRef\]](#)
21. Chali, S.W., Salih, M.H., Abate, A.T. (2018). Self-care practice and associated factors among Diabetes Mellitus patients on follow up in Benishangul Gumuz Regional State Public Hospitals, Western Ethiopia: A cross-sectional study. *BMC Research Notes*, 11(1), 833. [\[CrossRef\]](#)
22. Nagelkerk, J., Reick, K., Meengs, L. (2006). Perceived barriers and effective strategies to diabetes self-management. *Journal of Advanced Nursing*, 54(2), 151-158. [\[CrossRef\]](#)
23. Moradi-Lakeh, M., El Bcheraoui, C., Afshin, A., Daoud, F., AlMazroa, M.A., Al Saeedi, M., Basulaiman, M., Memish, Z.A., Al Rabeeah, A.A., Mokdad, A.H. (2017). Diet in Saudi Arabia: Findings from a nationally representative survey. *Public Health Nutrition*, 20(6), 1075-1081. [\[CrossRef\]](#)
24. Robling, M., McNamara, R., Bennert, K., Butler, C.C., Channon, S., Cohen D, Crowne, E., Hambly, H., Hawthorne, K., Hood, K., Longo, M., Lowes, L., Pickles, T., Playle, R., Pollnick, S., Thomas-Jones, E., Gregory J.W. (2012). The effect of the talking diabetes consulting skills intervention on glycaemic control and quality of life in children with type 1 diabetes: Cluster randomised controlled trial. *British Medical Journal*, 344(apr26 2), 2359. [\[CrossRef\]](#)
25. Asa, C., Maria, S., Katharina, S.S., Bert, A. (2012). Aquatic exercise is effective in improving exercise performance in patients with heart failure and type 2 diabetes mellitus. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 349209. [\[CrossRef\]](#)
26. Cugusi, L., Cadeddu, C., Nocco, S., Orrù, F., Bandino, S., Deidda, M., Caria, A., Bassareo, P.P., Piras, A., Cabras, S., Mercurio, G. (2015). Effects of an aquatic-based exercise program to improve cardio-metabolic profile, quality of life, and physical activity levels in men with type 2 diabetes mellitus. *PM&R: official scientific journal of the American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation*, 7(2), 141-148. [\[CrossRef\]](#)
27. Yi, W.M., Van Wieren Jones, E.M., Hansen, B.K., Vora, J. (2019). The impact of self-monitoring blood glucose adherence on glycemic goal attainment in an indigent population, with pharmacy assistance. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 44(9), 554-559. [\[CrossRef\]](#)

28. Erku, D.A., Ayele, A.A., Mekuria, A.B., Belachew, S.A., Hailemeskel, B., Tegegn, H.G. (2017). The impact of pharmacist-led medication therapy management on medication adherence in patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized controlled study. *Pharmacy Practice (Granada)*, 15(3), 1026. [\[CrossRef\]](#)
29. Lavery, J.V., Singer, P.A., Ridzon, R., Singh, J.A., Slutsky, A.S., Anisko, J.J., Buchanan, D. In global health research, is it legitimate to stop clinical trials early on account of their opportunity costs? *PLoS Medicine*, 6(6), e1000071. [\[CrossRef\]](#)
30. Ergün, S., Sivrikaya, S.K. (2012). Tip 1 diyabetli çocukların evde bakım uygulamaları ve yönetimi. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1(2), 90-95. From <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/520493>. Retrieved April 12, 2022.
31. Ersoy, M., Selcuk-Duru, H.N., Eevli, M., Ersoy, O., Civilibal, M. (2015). Aortic intima-media thickness and mean platelet volume in children with type 1 diabetes mellitus. *Iranian Journal of Pediatrics*, 25(2), e368. [\[CrossRef\]](#)
32. Müller, N., Stengel, D., Kloos, C., Ristow, M., Wolf, G., Müller, U. A. (2012). Improvement of HbA(1c) and stable weight loss 2 years after an outpatient treatment and teaching program for patients with type 2 diabetes without insulin therapy based on urine glucose self-monitoring. *International Journal of General Medicine*, 5, 241–247. [\[CrossRef\]](#)
33. Najafipour, F., Mobasser, M., Yavari, A., Nadrian, H., Aliasgarzadeh, A., Mashinchi Abbasi, N., Niafar, M., Houshyar Gharamaleki J, Sadra V. (2017). Effect of regular exercise training on changes in HbA1c, BMI and VO₂max among patients with type 2 diabetes mellitus: An 8-year trial. *British Medical Journal Open Diabetes Research & Care*, 5(1), e000414. [\[CrossRef\]](#)
34. Duke, S.A.S., Colagiuri, S., Colagiuri, R. (2009). Individual patient education for people with type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Systematic Review*, 1, CD005268. [\[CrossRef\]](#)
35. Cunningham, A.T., Crittendon, D.R., White, N., Mills, G.D., Diaz, V., LaNoue, M.D. (2018). The effect of diabetes self-management education on HbA1c and quality of life in African-Americans: A systematic review and meta-analysis. *BMC Health Services Research*, 18(1), 367. [\[CrossRef\]](#)



VIRTUAL SCREENING AND MOLECULAR DOCKING ANALYSIS ON THREE SARS-COV-2 DRUG TARGETS BY MULTIPLE COMPUTATIONAL APPROACH

ÇOKLU HESAPLAMALI YAKLAŞIMLA ÜÇ SARS-COV-2 İLAÇ HEDEFLERİ ÜZERİNDE
SANAL TARAMA VE MOLEKÜLER DOKİNG ANALİZİ

İsmail ÇELİK¹ , Meryem EROL^{1*} , Ebru UZUNHİSARCIKLİ² , Ufuk İNCE³ 

¹Erciyes University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Kayseri,
38039, Turkey

²Erciyes University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, Kayseri, 38039, Turkey

³Erciyes University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Kayseri,
38039, Turkey

ABSTRACT

Objective: SARS-CoV-2 is a pandemic virus characterized by upper respiratory tract infection and can range from mild symptoms to severe complications. In this case, drug repurposing and computer-aided studies have become very important to find emergency solutions. In this study, drug-target interactions on three nonstructural protein structures of SARS-CoV-2 of 8820 drug candidates or drug molecules obtained from the DrugBank database were analyzed.

Material and Method: Comprehensive virtual screening and molecular docking studies from 8820 drug molecules or candidates obtained from the DrugBank database were performed on the RNA binding protein, 2'-O-methyltransferase, and endoribonuclease of SARS-CoV-2; and potential drug candidates were determined for each target. Virtual screening studies have been done with High-Throughput Virtual Screening (HTVS), Standard Precision (SP), Extra Precision (XP), and Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area (MM-GBSA). Also, information about the clinical findings, transmission, pathogenesis, and treatment of SARS-CoV-2 has been given.

Result and Discussion: Drug-target interactions on three nonstructural protein structures of SARS-CoV-2 of 8820 drug candidates or drug molecules obtained from the DrugBank database were analyzed. Potential compound recommendations for each drug target were presented. Information was given about key amino acids where active sites of drug target proteins interact with ligands. This study is expected to be useful in target-based drug development studies on the proteins of SARS-CoV-2.

Keywords: SARS-CoV-2, molecular docking, virtual screening, DrugBank

* Corresponding Author /SorumluYazar: Meryem EROL
e-mail / e-posta: eczacimeryem@gmail.com, Phone / Tel.: +903522076666-28350

ÖZ

Amaç: SARS-CoV-2, üst solunum yolu enfeksiyonu ile karakterize pandemik bir virüstür ve hafif semptomlardan ciddi komplikasyonlara kadar gidebilmektedir. Bu durumda, ilaç yeniden kullanım ve bilgisayar destekli çalışmalar, acil çözümler bulmak için çok önemli hale geldi. Bu çalışmada, 8820 ilaç adayının SARS-CoV-2'nin yapısal olmayan üç protein yapısı DrugBank veri tabanından elde edilen ilaç adayları veya ilaç molekülleri ile olan ilaç-hedef etkileşimleri analiz edilmiştir.

Gereç ve Yöntem: DrugBank veri tabanından elde edilen 8820 ilaç molekülü veya ilaç adayının kapsamlı sanal tarama ve moleküler doking çalışmaları, SARS-CoV-2'nin RNA bağlayıcı proteini, 2'-O-metiltransferaz ve endoribonükleaz üzerinde gerçekleştirildi; ve her hedef için potansiyel ilaç adayları belirlendi. Yüksek Verimli Sanal Tarama (HTVS), Standard Precision (SP), Extra Precision (XP) ve Moleküler Mekanik Genelleştirilmiş Doğan Yüzey Alanı (MM-GBSA) ile sanal tarama çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca SARS-CoV-2'nin klinik bulguları, bulaşması, patogenezi ve tedavisi hakkında bilgiler de verilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: Her ilaç hedefi için potansiyel bileşik önerileri sunuldu. İlaç hedefproteinlerinin aktif bölgelerinin ligandlarla etkileşime girdiği kilit amino asitler hakkında bilgi verildi. Bu çalışmanın SARS-CoV-2 proteinleri üzerinde hedef bazlı ilaç geliştirme çalışmalarında faydalı olması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: SARS-CoV-2, moleküler doking, sanal tarama, DrugBank

INTRODUCTION

World-threatening coronavirus disease-2019 (COVID-19) is a respiratory disease caused by enveloped, positive-polarity, single-chain RNA betacoronavirus, also referred to as SARS-CoV-2 [1]. First, cases of pneumonia of unknown etiology were reported in November 2019 in Wuhan, Hubei Province, China [2]. On January 7, 2020, it was identified that the disease agent was a new coronavirus (2019-nCoV), which had not previously been detected in humans. The name of the disease was later named SARS-CoV-2 because of its close resemblance to SARS-CoV. The World Health Organization (WHO) declared the COVID-19 outbreak an international public health emergency on January 30, 2020, and identified it as a global pandemic on March 11, due to the incidence of COVID-19 in 113 countries outside China [3, 4]. However, much of what we can deduce about the biology of SARS-CoV-2 comes from previous studies on SARS-CoV. Based on these data, the molecular mechanisms underlying this virus's evolution, adaptation, and spread require urgent investigation. Difficulties in controlling COVID-19, the disease's incubation period is due to epidemiological parameters such as infected people becoming infectious and infecting others before they show any symptoms or realize they have the disease. The COVID-19 pandemic has had negative consequences in all areas of life (economy, education, health, social) [5].

Coronaviruses belong to the Coronaviridae family and Coronavirinae subfamily, respectively. This subfamily is divided into four types based on their evolutionary relationship and gene sequences: alphacoronavirus, betacoronavirus, gammacoronavirus, and deltacoronavirus. Alphacoronavirus and betacoronavirus species primarily infect mammals, gammacoronavirus, and deltacoronavirus predominantly birds [6]. Along with SARS-CoV-2, the number of coronavirus species causing infection

in humans has been seven. Among these viruses, HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, and HCoV-HKU1 circulate in the winter months, causing mild to moderate respiratory infections in adults and children. SARS-CoV and “Middle East respiratory syndrome; MERS”- After CoV, SARS-CoV-2 was the third β -coronavirus that caused severe acute respiratory infections [7].

SARS-CoV first appeared in Guangdong province of China in November 2002 and was recognized as a global threat by the World Health Organization (WHO) in March 2003. This epidemic continued until July 2003, with 8098 confirmed cases and 774 deaths (9.6%) in 26 countries [8]. MERS-CoV emerged in Saudi Arabia in September 2012, and 2494 cases and 858 deaths (35%) were confirmed by laboratory testing from 27 countries. The transmission of MERS-CoV from person to person was limited, and its clinical findings were similar to SARS [9]. Without a specific mortality rate (currently in the range of ~ 1-6%), COVID-19 is believed to be less lethal than SARS (~ 10%) or MERS (~ 35%); however, the number of breeding is estimated to be 2.0-6.5 higher than SARS and MERS [10]. However, the exact measurement of the mortality rate is possible only when the pandemic is over because the total mortality formula is valid only when all cases result.

The zoonotic source of SARS-CoV-2 has not been fully verified, but it is estimated that it is bats according to sequence analysis. A 96% similarity was reported between the gene sequence of the SARS-CoV-2 and the bat coronavirus in a study using the genetic sequencing method. Studies have shown that SARS-CoV-2 shares 79.5% of its genome with SARS-CoV, which is sufficient to be considered different from SARS-CoV [11]. After entering the host, it has been reported that SARS-CoV-2 remains in the respiratory system for several days, an asymptomatic period. Although the incubation period varies between 4.8 and 6.5 days in COVID-19, it is longer in some studies [12]. The virus has been found to last up to 14 days in severe cases and up to 8 days in non-serious cases [13]. It has been observed that the viral load profile peaked at the onset of symptoms and, therefore, can be easily transmitted at an early stage of infection. Severe cases have a high viral load and can potentially be used as markers of case severity and prognosis. The primary mode of transmission is respiratory droplets, and transmission rates seem similar for asymptomatic and symptomatic patients [14].

The size of coronaviruses showing pleomorphic or spherical morphological features varies between 80-220 nm. It has a large envelope of lipid structure with peplomer protrusions on it. Its genome, approximately 26-32 kb in length, surrounds a tubular nucleocapsid with helical symmetry. It has a positive sense of RNA as a 29.9 kb size genetic material that is roughly distributed between adenosines (30%), cytosines (18%), guanines (20%), and resting thymines (32%) [15]. The 5' end of the RNA genome is titled, and the 3' end is polyadenylated. The 5' end of the genome contains an untranslated region, and this replicase complex encodes a total of 27 proteins divided into structural and non-structural proteins (NSP). The structural and auxiliary proteins are encoded with a 10 kb genome

region close to the 3' end. The CoV genome consists of S (Spike), E (Envelope), M (Membrane), and N (Nucleocapsid) structural proteins that make up about 33% of the entire genome and are vital for the viral life cycle. The remaining 67% were distributed among genes encoding 16 different NSPs throughout the ORF [16]. They are involved in virus-cell receptor interactions during viral entry. Sequence studies have shown differences between SARS-CoV-2 and SARS-CoV, such as the absence of the 8a gene or changes in the number of base pairs in the 8b and 3c genes SARS-CoV-2 [17]. These proteins have been extensively researched to design new antiviral agents against COVID-19 because genome and 3D structures show that parent drug binding pockets are probably protected in SARS-CoV-2, SARS, and MERS. It has also been demonstrated that both SARS CoV-2 and SARS-CoV have similar receptor binding domains [18]. SARS CoV has 14 binding residues with the human angiotensin-converting enzyme-2 (ACE-2) receptor. In the new SARS-CoV-2, 8 of these, 14 were observed [11].

Coronaviruses bind to the host cells via the spike (S) protein on the outer surface and enter the cell. S protein recognizes the receptor in the target cell and regulates the virus's entry into the host cell. The virus's life cycle begins by binding the S protein to the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor on the host cell surface. After binding to the receptor, changing the S protein structure makes it easy for the virus to fuse into the cell and remove its sheath. Then, SARS-CoV-2 RNA is released inside the cell. The following steps are translating RNA into viral replicase polyproteins and cleavage into small pieces by viral proteinases. A series of mRNAs are produced as a result of continuous transcription by a polymerase chain reaction, and translation to viral proteins occurs. Viral proteins and the RNA genome join the virions inside the endoplasmic reticulum and Golgi body and are released out of the cell [19]. The S protein of SARS-CoV-2, a combination of bat SARS-CoV and an unknown β -CoV virus, contains a 3-dimensional receptor-binding domain (RBD) that protects the Van der Waals bonds [20, 21]. Lung epithelial cells are the primary target of the virus. 394 glutamine residues in the RBD region of SARS-CoV-2 are recognized by the lysine residue at the human ACE2 receptor [22].

Although currently, there are no FDA-approved antiviral drugs for the treatment of human coronavirus infections, including COVID-19; currently available inactive virus vaccine (Sinovac), non-replicating viral vector vaccine ChAdOx1 (AZD1222) (AstraZeneca/Oxford), RNA-based virus vaccine BNT162b2 (3LNP-mRNAs) (Pfizer/BioNTech), RNA-based virus vaccine mRNA-1273 (Moderna) vaccine available [23]. Various drug clinical trials are in progress to try possible therapies; the treatment focuses on alleviating symptoms, including a dry cough and fever [24]. Following this, antiviral efficiencies of several FDA-approved drugs have been reported, including Remdesivir and favipiravir, against a clinical isolate of SARS-CoV-2 *in vitro* showed potential inhibition at low-micromolar concentrations [25].

Remdesivir is an adenosine triphosphate analog first described in the literature in 2016 as a potential treatment for Ebola [26]. In 2017, its activity against the coronavirus family of viruses was also demonstrated [27]. Remdesivir is also being researched as a potential treatment for SARS-CoV-2, the coronavirus responsible for COVID-19. Remdesivir was granted an FDA Emergency Use Authorization on 1 May 2020. This is not the same as FDA approval but is currently in clinical trials in several countries as a therapeutic for COVID-19 infections [28]. Remdesivir, a phosphoramidite prodrug containing a 1'-cyano modification of the sugar, is converted into cells into an adenosine triphosphate analog, which was shown to be an inhibitor of the RdRps of SARS-CoV and SARS-CoV-2. Remdesivir triphosphate was incorporated with higher efficiency than ATP by coronavirus RdRps, leading to delayed termination of RNA synthesis, thereby overcoming excision by the viral exonuclease [23, 29].

Favipiravir is a modified pyrazine analog that was initially approved for therapeutic use in resistant cases of influenza. The antiviral targets RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) enzymes necessary for the transcription and replication of viral genomes [30]. Not only does Favipiravir inhibits the replication of influenza A and B, and it may be an alternative option for influenza strains that are resistant to neuraminidase inhibitors [31]. Favipiravir has been investigated to treat life-threatening pathogens such as the Ebola virus, Lassa virus, and COVID-19. Favipiravir may have potential antiviral action on SARS-CoV-2, an RNA virus. The preliminary results from a total of 80 patients (including the experimental and control groups) indicated that Favipiravir had more potent antiviral action than lopinavir/ritonavir. No significant adverse reactions were noted in the Favipiravir treatment group [32, 33].

Molnupiravir (Lagevrio[®]) is an orally administered, small molecule, an antiviral prodrug that inhibits replication of RNA viruses through viral error induction. The drug was developed by Merck and Ridgeback Biotherapy for the prevention and treatment of COVID-19. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, the causative virus of COVID-19, uses the RdRp complex for replication. Molnupiravir received its first UK approval on 4 November 2021 to treat mild to moderate COVID-19 in adults with a positive SARS-CoV-2 diagnostic test and at least one risk factor for developing a serious illness. The recommended dose of molnupiravir is 800 mg every 12 hours for five days. It should be administered as soon as possible after the diagnosis of COVID-19 and within five days of the onset of symptoms. Molnupiravir has been filed for approval for the treatment of COVID-19 in many countries, including those in the USA, Japan, and the EU, and is authorized for emergency use. In addition, a multinational phase III study is evaluating molnupiravir for post-exposure prophylaxis against COVID-19 [34, 35].

Especially, SARS-CoV-2 proteins can be targeted to interrupt their life cycle [36]. In this article, we aim to perform the discovery of the potential candidates against SARS-CoV-2 through virtual screening of 8820 drug molecules and candidates and build a focused library of novel potential compounds.

MATERIAL AND METHOD

Molecular docking studies and other calculations were carried out with the Schrödinger Maestro module. Firstly, NSP9 replicase (PDB: 6W4B), NSP15 endoribonuclease (PDB: 6VWW), NSP16 2'-O-methyltransferase (PDB: 6W75) crystal structures were imported from the protein data bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>) into the 'Protein Preparation Wizard' module. Hydrogens were added, non-bonding command with metals, the formation of disulfide bonds, deletion of water at 5 Å distance from het groups, and preprocess by creating pH: 7.00±2.00 het states using Epik. Subsequently, the appropriate chain was selected. Water molecules and metals contained in protein crystal structures were retained, and molecules other than the protein structure were deleted. pH: 7.00±2.00 regenerate state was created with S2. Finally, H bond determination was optimized using PROPKA pH: 7.00 with water sample orientation, and protein was prepared by minimizing OPLS3 force fields. The 8820 drug molecules and candidates from DrugBank Release Version 5.1.7 database (<https://www.DrugBank.ca/releases/latest#structures>) were downloaded in 3D SDF file format, and data was entered into the 'Ligprep' module. The OPLS3 force field was preferred, and ionization was carried out using Epik in the range of possible pH: 7.00±2.00; desalinated and tautomer-formed ligand structures were prepared. Data from PDB and scientific literature determined the active site of the SARS-CoV-2 protein structures. Grid determination was run by clicking any atom of the ligand or residue, and the default box was prepared by the 'Receptor Grid Generation' module.

Finally, for the calculation of theoretical ligand-protein interactions, virtual screening was performed with High Throughput Virtual Screening (HTVS), Standard Precision (SP), and Extra Precision (XP) by using flexible ligand options of the 'Glide Ligand Docking' module. Calculation of Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area (MM-GBSA) interaction energies was performed to improve docking scores and detect protein-ligand interactions. Results of the Docking score, Glide score, Glide emodel, and MM-GBSA dG Bind was evaluated, and 2D/3D interactions of ligand and protein were determined and exhibited.

RESULT AND DISCUSSION

NSP9 RNA Binding Protein

RNA replicase, as NSP9 is reported as a single-stranded RNA-binding protein, has a dimeric structure [37]. Although the mechanism of binding to nucleic acid and dimerization of this enzyme remains uncertain, it is thought to be located in the Coronavirus RNA replication complex [38]. The dimeric structure of NSP 9 is essential for the pathogenicity of the virus. Thereby, the disruption of the coronaviruses' dimeric structure will be an essential factor in antiviral treatment targets against this structure [39]. The fourth study was performed on the crystal structure of COVID-19 Nsp9 RNA binding

protein (PDB Code: 6W4B). According to the estimated free binding energies, some evaluated drugs could act as SARS-CoV-2 NSP-9 inhibitors (Table 1). In Figure 1, the binding pose of the compound DB04158 in the RNA binding protein active site was shown.

Table 1. The highest interacting compounds in the RNA binding protein active site of SARS-CoV-2 (PDB: 6W4B)

DrugBank ID	Docking score	Glide gscore	Glide emodel	MMGBSA (dG Bind)
DB01661	-10.368	-10.368	-80.994	-37.05
DB02338	-9.724	-9.724	-89.830	-39.94
DB02319	-9.346	-9.346	-89.717	-40.93
DB13755	-9.169	-9.169	-80.215	-94.13
DB03186	-9.048	-9.048	-88.754	-55.64
DB03962	-8.895	-8.895	-79.137	-66.94
DB02498	-8.551	-8.551	-78.372	-47.89
DB01906	-8.517	-8.517	-53.004	-45.71
DB01362	-8.437	-8.437	-64.659	-81.89
DB04983	-8.330	-8.330	-85.622	-45.75
DB04158	-8.044	-8.044	-81.708	-63.06

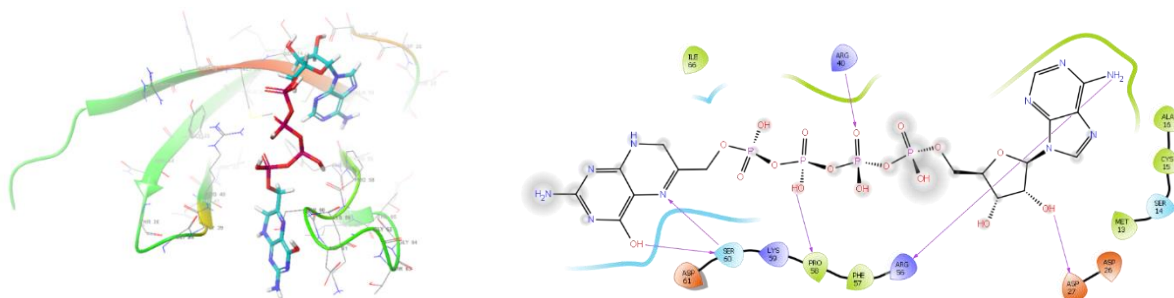


Figure 1. Interaction of SARS-CoV-2 with 6-(adenosine tetraphosphate-methyl)-7,8-dihydropterin [DB04158] in the RNA binding protein active site

CYS74, LEU107, LEU113, 199 ALA108, LEU5, ASN34, LEU98, ASN96, LEU98, PHE41, THR36, ALA9, LEU104, VAL8, 200 ALA108, ASN99, and SER6, are active site residues of essential NSP9 RNA binding protein.

NADPH [DB02338] is the reduced form of NADP⁺, used in anabolic reactions, such as lipid and nucleic acid synthesis, which require NADPH as a reducing agent. It has a role as a major metabolite and a cofactor. It is a NAD(P)H and an NADP. It is the conjugate acid of an NADPH. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. A coenzyme composed of ribosylnicotinamide 5'-phosphate (NMN)

coupled with pyrophosphate linkage to the 5'-phosphate adenosine 2',5'-bisphosphate. It is an electron carrier in several reactions, alternately oxidized (NADP⁺) and reduced (NADPH). Thrombotic complications of COVID-19 may reflect an upregulation of endothelial tissue factor expression that is contingent on the activation of endosomal NADPH oxidase. When single-stranded RNA viruses are taken up into cellular endosomes, they stimulate endosomal formation and activation of NADPH oxidase complexes via RNA-responsive toll-like receptor 7. Therefore, it is proposed that SARS-CoV-2 infection of endothelial cells evokes TF expression, which is contingent on endosomal NADPH oxidase activation [40]. 5,6-Dihydroxy-NADP [DB02319] belongs to the class of organic compounds known as purine nucleotide sugars. These are purine nucleotides bound to a saccharide derivative through the terminal phosphate group. Locarmic Acid [DB13755] is formed when a bridge of adipic acid links two molecules of iothalamic acid (Conray) deprived of an acetyl group. It has been called 'Conray Dimer,' but it is not strictly a polymer as it is not composed only of 2 molecules of Conray but has the additional adipic acid. It is a dibasic acid and therefore combines with two cations. Locarmic acid is a molecule used as a contrast medium. It is one of the biologically active dicarboxylic acid compounds. It has side effects such as hypermotility, diarrhea, and convulsions [41].

Adenylate-3'-phosphate-[[2'-deoxy-uridine-5'-phosphate]-3'-phosphate] [DB03186] belongs to the class of organic compounds known as (3'->5')-dinucleotides. These are dinucleotides where the two bases are connected via a (3'->5')-phosphodiester linkage. Endonuclease catalyzes the cleavage of RNA on the 3' side of pyrimidine nucleotides. Acts on single-stranded and double-stranded RNA. Nicotinamide 8-bromo-adenine dinucleotide phosphate [DB03962] belongs to the class of organic compounds known as (5'->5')-dinucleotides. These are dinucleotides where the two bases are connected via a (5'->5')-phosphodiester linkage. Carba-nicotinamide-adenine-dinucleotide [DB02498] may serve as a stable cofactor for the enzyme-based detection of glucose [42]. Iohexol [DB01362] is an effective non-ionic, water-soluble contrast agent used in myelography, arthrography, nephroangiography arteriography, and other radiographic procedures. Its low systemic toxicity is the combined result of low chemotoxicity and low osmolality. Organic iodine compounds block x-rays as they pass through the body, thereby allowing body structures containing iodine to be delineated in contrast to those that do not contain iodine. The degree of opacity produced by these compounds is directly proportional to the total amount (concentration and volume) of the iodinated contrast agent in the path of the x-rays. After intrathecal administration into the subarachnoid space, diffusion of iohexol in the CSF allows the visualization of the subarachnoid spaces of the head and spinal canal. After intravascular administration, iohexol makes opaque those vessels in its path of flow, allowing visualization of the internal structures until significant hemodilution occurs (Figure 2). Also, iohexol has been used for GFR measurements in pediatric, elderly, and Type I and II diabetic populations [43].

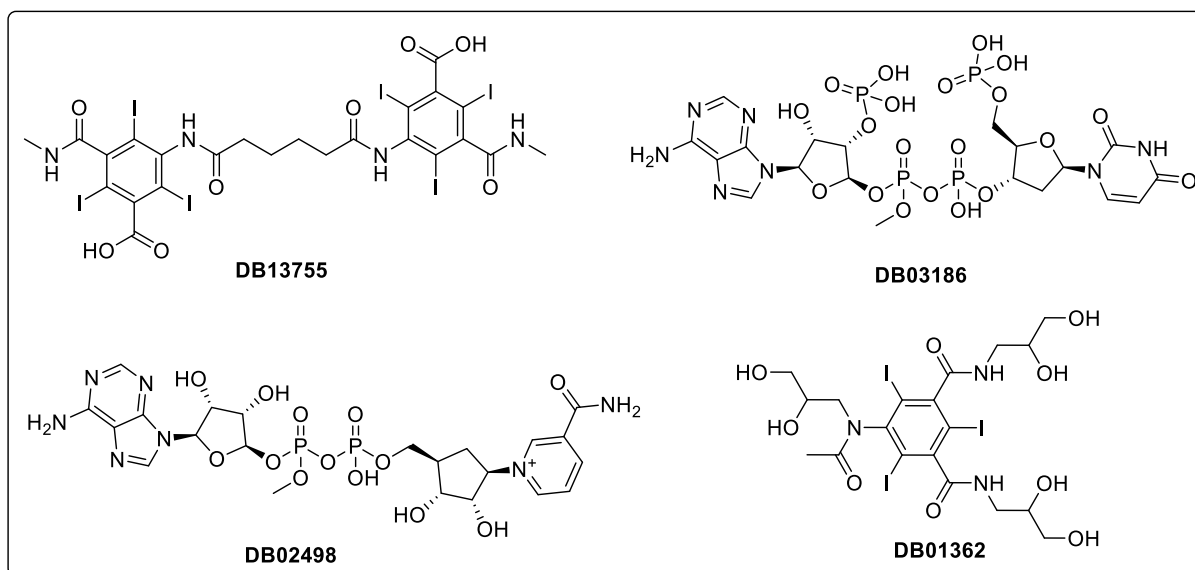


Figure 2. Potential SARS-CoV-2 RNA binding protein inhibitor compounds from the DrugBank database

NSP16 2'-O-methyltransferase

NSP16 in Coronaviruses performs methylation of the cap of the C2'-hydroxyl group of the following nucleotide. This is a necessary process for the virus's lifecycle [44]. NSP10 as a cofactor enhances the activity of NSP16. Although the mechanism of enzymatic action of NSP10 and NSP16 is not known, they have good potential for antiviral activity studies in medicinal chemistry [45]. Because the inhibition of the activity of the O-methyl-transferase can cause a reduction of viral replication and pathogenicity of coronaviruses, it is reported that the interaction of these NSPs may be deactivated by the short peptides derived from NSP10, and this is caused by O-methyl-transferase inhibition [46]. The fifth study was performed on the 1.95 Å resolution crystal structure of the NSP10 - NSP16 complex (PDB Code: 6W75). According to the estimated free binding energies, some evaluated drugs could act as SARS-CoV-2 NSP10-NSP16 inhibitors (Table 2). In Figure 3, the binding pose at the 2'-O-methyltransferase active site of the compound DB03883 was shown.

Important active site amino acids for 2'-O-methyltransferase are CYS6913, ASP6912, ASP6897, GLY6879, ASN6841, ASP6928, GLY6869, LEU6898, and MET6929.

Adenosine-5'-[Beta, Gamma-Methylene]Triphosphate [DB03909] belongs to the class of organic compounds known as purine ribonucleoside monophosphates. These are nucleotides consisting of a purine base linked to a ribose to which one monophosphate group is attached. Adenosine 5'-methylenediphosphate [DB03148] belongs to the class of organic compounds known as purine ribonucleoside monophosphates, like the previous molecule. Adenosine phosphate [DB00131] is the adenine nucleotide containing a phosphate group esterified to the sugar moiety at the 2'-, 3'- or 5'-

position and is also known as adenylic acid. Adenosine monophosphate, AMP, is a nucleotide that is found in RNA. It is an ester of phosphoric acid with the nucleoside adenosine. AMP consists of the phosphate group, the pentose sugar ribose, and the nucleobase adenine. AMP is used as a dietary supplement to boost immune activity and is also used as nutritional supplementation, even for treating dietary shortages or imbalance. NAD, NADP, and the adenylates (i.e., ATP, ADP, and AMP) are the primary regulatory components for any living organism. NAD and NADP are cofactors that act as primary electron carriers in cells. They are reduced by proteins during organic or inorganic matter oxidation and oxidized by proteins involved in respiratory or anabolic processes (Figure 4) [47]. Additionally, according to our study, it was seen that Denufosol [DB04983] could be one of the target molecules for NSP10 - NSP16 as well as NSP-9.

Table 2. The highest interacting compounds in the 2'-O-methyltransferase active site of SARS-CoV-2 (PDB: 6W75)

DrugBank ID	Docking score	Glide gscore	Glide emodel	MMGBSA (dG Bind)
DB03909	-16.385	-16.385	-149.900	-90.39
DB03148	-14.124	-14.124	-140.407	-82.91
DB03883	-13.968	-13.968	-106.783	-74.04
DB03708	-13.587	-13.587	-134.589	-84.40
DB02902	-13.467	-13.467	-127.326	-85.23
DB04983	-13.350	-13.350	-111.547	-57.35
DB03458	-13.349	-13.349	-131.126	-86.46
DB04366	-13.332	-13.332	-132.399	-82.68
DB03464	-13.213	-13.213	-104.830	-69.22
DB00131	-13.115	-13.115	-108.655	-60.46

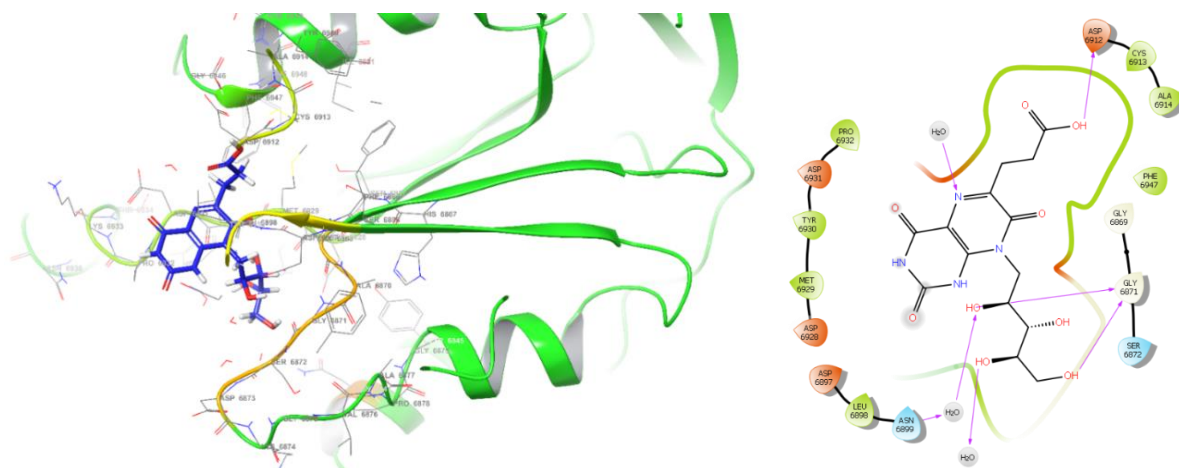


Figure 3. Interaction of SARS-CoV-2 with Carboxyethylumazine [DB03883] in the 2'-O-methyltransferase active site

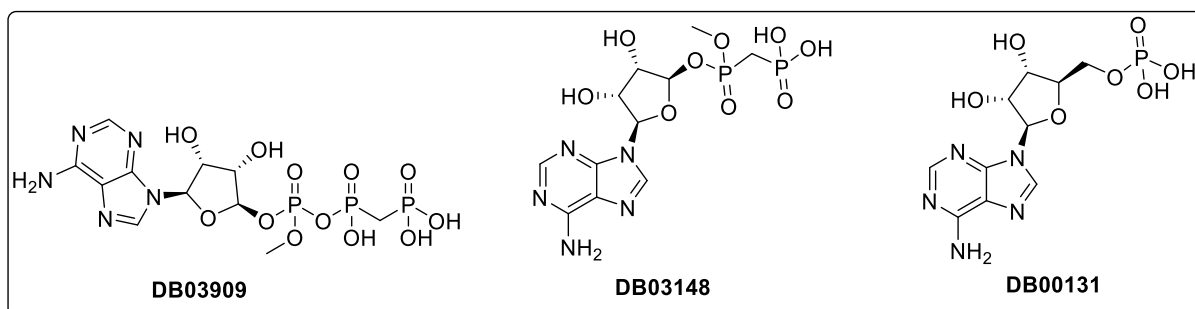


Figure 4. Potential SARS-CoV-2 2'-O-methyltransferase inhibitor compounds from the DrugBank database.

NSP15 Endoribonuclease

NSP15, as nidoviral uridylylate specific endoribonuclease (NendoU), is a member of the EndoU family that plays a role in viral RNA processes. Enzymatic activity of this protein is reported to be increased with Mn^{+2} [48]. This protein is conserved in nidoviruses (coronaviruses and arteriviruses), and its function is to cleave 3' ends of uridylylates of RNA molecules [49]. Although the presence of NendoU in the viral replication is essential, coronaviruses that do not have this protein are reported to be replicated. The ninth study was performed on the structure of the COVID-19 NSP15 endoribonuclease (PDB Code: 6VWW). According to the estimated free binding energies, some evaluated drugs could act as SARS-CoV-2 NSP15 endoribonuclease inhibitors (Table 3). Figure 5 shows the binding pose at the endoribonuclease active site of DB04663.

Table 3. The highest interacting compounds in the NSP15 Endoribonuclease active site of SARS-CoV-2 (PDB: 6VWW).

DrugBank ID	Docking score	Glide gscore	Glide emodel	MMGBSA (dG Bind)
DB04663	-10.704	-10.704	-50.680	-43.84
DB01661	-10.483	-10.483	-97.611	-51.32
DB03797	-10.337	-10.337	-88.501	-64.81
DB02393	-10.208	-10.208	-51.170	-48.75
DB02738	-10.177	-10.177	-88.432	-55.18
DB03725	-10.125	-10.125	-78.298	-45.37
DB04023	-10.080	-10.080	-73.818	-64.10
DB02312	-10.065	-10.065	-50.544	-42.02
DB03161	-9.772	-9.772	-78.517	-57.45
DB03532	-9.723	-9.723	-83.812	-46.42

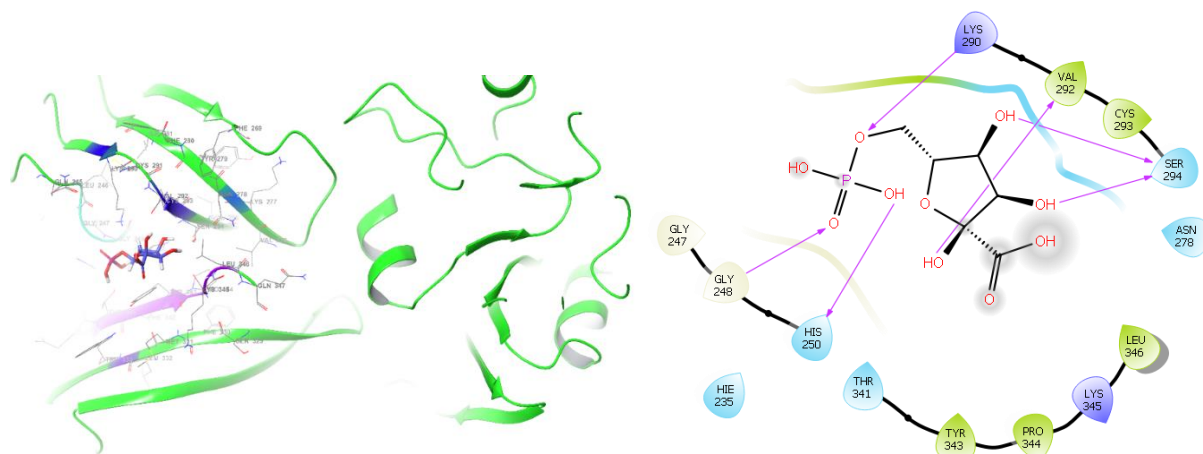


Figure 5. Interaction of SARS-CoV-2 with 2-Keto-6-Phosphate-D-Gluconic Acid [DB04663] in the endoribonuclease active site

ASN 278, THR 341, SER 294, GLN 245, HER 338, ALA 232, CYS 291, VAL 292, LYS 345, LYS 335, LYS 290, HIP 235, and GLN 245 contain important active site NSP15 Endoribonuclease residues.

2-Keto-6-Phosphate-D-Gluconic Acid, Alpha-Furanose Form [DB04663] belongs to the class of organic compounds known as pentose phosphates. These are carbohydrate derivatives containing a pentose substituted by one or more phosphate groups (Figure 6). According to our study, Adenosine-5'-Pentaphosphate [DB02738] and 1-(5-Phospho-D-ribose)-ATP [DB01661], described in other sections above, may be one of the target molecules for NSP15 endoribonuclease.

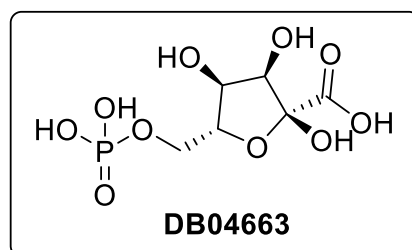


Figure 6. Potential SARS-CoV-2 endoribonuclease inhibitor compounds from the DrugBank database.

Consequently, in this study, drug-target interactions on three nonstructural protein structures of SARS-CoV-2 of 8820 drug candidates or drug molecules obtained from the DrugBank database were analyzed. Potential compound recommendations for each drug target were presented. Information was given about key amino acids where active sites of drug target proteins interact with ligands. The latest updated information on the clinical findings, transmission, pathogenesis, and treatment of SARS-CoV-

2 has also been presented. This study is expected to be useful in target-based drug development studies on the proteins of SARS-CoV-2.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception: İ.Ç., M.E.; Design: İ.Ç., M.E.; Supervision: İ.Ç., M.E.; Resources: İ.Ç., M.E., E.U., U.İ.; Materials: İ.Ç., M.E.; Data Collection and/or processing: İ.Ç., M.E.; Analysis and/or interpretation: İ.Ç., M.E.; Literature search: İ.Ç., M.E., E.U., U.İ.; Writing manuscript: İ.Ç., M.E., E.U., U.İ.; Critical review: İ.Ç., M.E., E.U., U.İ.; Other: E.U., U.İ.

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. Romano, M., Ruggiero, A., Squeglia, F., Maga, G., Berisio, R. (2020). A Structural view of sars-cov-2 RNA replication machinery: RNA synthesis, proofreading and final capping. *Cells*, 9(5), 1-22. [\[CrossRef\]](#)
2. Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R. (2020). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*. 382(8), 727-733. [\[CrossRef\]](#)
3. Cucinotta, D., Vanelli, M. (2020). WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta bio-medica: Atenei Parmensis*, 91(1), 157-160. [\[CrossRef\]](#)
4. Organization, W. H. (2020). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): situation report, 82.
5. Nunes-Vaz, R. (2020). Visualising the doubling time of COVID-19 allows comparison of the success of containment measures. *Global Biosecurity*, 1(3). [\[CrossRef\]](#)
6. Woo, P.C., Lau, S.K., Lam, C.S., Lau, C.C., Tsang, A.K., Lau, J.H., Bai, R., Teng, J.L., Tsang, C. C., Wang, M. (2012). Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *Journal of Virology*, 86(7), 3995-4008. [\[CrossRef\]](#)

7. Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y.-M., Wang, W., Song, Z.-G., Hu, Y., Tao, Z.-W., Tian, J.-H., Pei, Y.-Y. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798), 265-269. [\[CrossRef\]](#)
8. Cheng, V.C., Lau, S.K., Woo, P.C., Yuen, K.Y. (2007). Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(4), 660-694. [\[CrossRef\]](#)
9. Berry, M., Gamiieldien, J., Fielding, B.C. (2015). Identification of new respiratory viruses in the new millennium. *Viruses*, 7(3), 996-1019. [\[CrossRef\]](#)
10. Liu, Y., Gayle, A.A., Wilder-Smith, A., Rocklöv, J. (2020). The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus. *Journal of Travel Medicine*, 27(2), 1-4. [\[CrossRef\]](#)
11. Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270-273. [\[CrossRef\]](#)
12. Liu, T., Hu, J., Xiao, J., He, G., Kang, M., Rong, Z., Lin, L., Zhong, H., Huang, Q., Deng, A. (2020). Time-varying transmission dynamics of Novel Coronavirus Pneumonia in China. *BioRxiv*, 27(2), 1-4. [\[CrossRef\]](#)
13. Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R. (2020). China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *The New England Journal of Medicine*, 382(8), 727-733. [\[CrossRef\]](#)
14. Liu, Y., Yan, L.-M., Wan, L., Xiang, T.-X., Le, A., Liu, J.-M., Peiris, M., Poon, L.L., Zhang, W. (2020). Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(6), 656-657. [\[CrossRef\]](#)
15. Sah, R., Rodriguez-Morales, A.J., Jha, R., Chu, D.K., Gu, H., Peiris, M., Bastola, A., Lal, B.K., Ojha, H.C., Rabaan, A.A. (2020). Complete genome sequence of a 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) strain isolated in Nepal. *Microbiology Resource Announcements*, 9(11). [\[CrossRef\]](#)
16. Cui, J., Li, F., Shi, Z.-L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 181-192. [\[CrossRef\]](#)
17. Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P., Meng, J., Zhu, Z., Zhang, Z., Wang, J. (2020). Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host & Microbe*, 27(3), 325-328. [\[CrossRef\]](#)
18. Khan, S., Siddique, R., Shereen, M.A., Ali, A., Liu, J., Bai, Q., Bashir, N., Xue, M. (2020). Erratum: emergence of a novel coronavirus, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Journal of Clinical Microbiology*, 58: 5, e00187-20. [\[CrossRef\]](#)
19. Shereen, M.A., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N., Siddique, R. (2020). COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research*, 24, 91-98. [\[CrossRef\]](#)

20. Xu, X., Chen, P., Wang, J., Feng, J., Zhou, H., Li, X., Zhong, W., Hao, P. (2020). Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Science China Life Sciences*, 63(3), 457-460. [\[CrossRef\]](#)
21. Li, B., Si, H.-R., Zhu, Y., Yang, X.-L., Anderson, D.E., Shi, Z.-L., Wang, L.-F., Zhou, P. (2020). Discovery of bat coronaviruses through surveillance and probe capture-based next-generation sequencing. *Mosphere*, 5(1). [\[CrossRef\]](#)
22. Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R. S., Li, F. (2020). Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *Journal of Virology*, 94(7). [\[CrossRef\]](#)
23. Jockusch, S., Tao, C., Li, X., Anderson, T.K., Chien, M., Kumar, S., Russo, J.J., Kirchdoerfer, R. N., Ju, J. (2020). A library of nucleotide analogues terminate RNA synthesis catalyzed by polymerases of coronaviruses that cause SARS and COVID-19. *Antiviral Research*, 180, 104857. [\[CrossRef\]](#)
24. Mirza, M. U., Froeyen, M. (2020). Structural elucidation of SARS-CoV-2 vital proteins: Computational methods reveal potential drug candidates against main protease, Nsp12 polymerase and Nsp13 helicase. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 10(4), 320-328. [\[CrossRef\]](#)
25. 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(3), 269-271. [\[CrossRef\]](#)
26. Warren, T.K., Jordan, R., Lo, M.K., Ray, A.S., Mackman, R.L., Soloveva, V., Siegel, D., Perron, M., Bannister, R., Hui, H.C. (2016). Therapeutic efficacy of the small molecule GS-5734 against Ebola virus in rhesus monkeys. *Nature*, 531(7594), 381-385. [\[CrossRef\]](#)
27. Sheahan, T.P., Sims, A.C., Graham, R.L., Menachery, V.D., Gralinski, L.E., Case, J.B., Leist, S. R., Pyrc, K., Feng, J.Y., Trantcheva, I. (2017). Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses. *Science Translational Medicine*, 9(396), 1-20. [\[CrossRef\]](#)
28. Hillaker, E., Belfer, J.J., Bondici, A., Murad, H., Dumkow, L.E. (2020). Delayed initiation of remdesivir in a COVID-19-positive patient. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 40(6), 592-598. [\[CrossRef\]](#)
29. Gordon, C.J., Tchesnokov, E.P., Feng, J.Y., Porter, D. P., Götte, M. (2020). The antiviral compound remdesivir potently inhibits RNA-dependent RNA polymerase from Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Biological Chemistry*, 295(15), 4773-4779. [\[CrossRef\]](#)
30. Furuta, Y., Komeno, T., Nakamura, T. (2017). Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 93(7), 449-463. [\[CrossRef\]](#)
31. Hayden, F. G., Shindo, N. (2019). Influenza virus polymerase inhibitors in clinical development. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 32(2), 176-186. [\[CrossRef\]](#)
32. Nagata, T., Lefor, A. K., Hasegawa, M., Ishii, M. (2015). Favipiravir: a new medication for the Ebola virus disease pandemic. *Disaster Medicine and Public Health Preparedness*, 9(1), 79-81. [\[CrossRef\]](#)

33. Dong, L., Hu, S., Gao, J. (2020). Discovering drugs to treat coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Drug Discoveries & Therapeutics*, 14(1), 58-60. [\[CrossRef\]](#)
34. Syed, Y.Y. (2022). Molnupiravir: First Approval. *Drugs*, 82, 455–460. [\[CrossRef\]](#)
35. Singh, A.K., Singh, A., Singh, R., Misra, A. (2021). Molnupiravir in COVID-19: a systematic review of literature. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 15(6), 102329. [\[CrossRef\]](#)
36. Parks, J. M., Smith, J.C. (2020). How to discover antiviral drugs quickly. *New England Journal of Medicine*, 382(23), 2261-2264. [\[CrossRef\]](#)
37. Egloff, M.-P., Ferron, F., Campanacci, V., Longhi, S., Rancurel, C., Dutartre, H., Snijder, E. J., Gorbalenya, A. E., Cambillau, C., Canard, B. (2004). The severe acute respiratory syndrome-coronavirus replicative protein nsp9 is a single-stranded RNA-binding subunit unique in the RNA virus world. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(11), 3792-3796. [\[CrossRef\]](#)
38. Zeng, Z., Deng, F., Shi, K., Ye, G., Wang, G., Fang, L., Xiao, S., Fu, Z., Peng, G. (2018). Dimerization of coronavirus nsp9 with diverse modes enhances its nucleic acid binding affinity. *Journal of Virology*, 92(17), 1-15. [\[CrossRef\]](#)
39. Hu, T., Chen, C., Li, H., Dou, Y., Zhou, M., Lu, D., Zong, Q., Li, Y., Yang, C., Zhong, Z. (2017). Structural basis for dimerization and RNA binding of avian infectious bronchitis virus nsp9. *Protein Science*, 26(5), 1037-1048. [\[CrossRef\]](#)
40. DiNicolantonio, J.J., McCarty, M. (2020). Thrombotic complications of COVID-19 may reflect an upregulation of endothelial tissue factor expression that is contingent on activation of endosomal NADPH oxidase. *Open Heart*, 7(1), e001337. [\[CrossRef\]](#)
41. Grainger, R.G. (1971). Future Prospects in diagnostic radiology: radiological contrast media: the present and the future. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 64(3), 243-249. [\[CrossRef\]](#)
42. Von Ketteler, A., Hertel, D.P., Petrich, W. (2012). Fluorescence properties of carba nicotinamide adenine dinucleotide for glucose sensing. *ChemPhysChem*, 13(5), 1302-1306. [\[CrossRef\]](#)
43. Djabri, A., van't Hoff, W., Brock, P., Wong, I.C., Guy, R.H., Delgado-Charro, M.B. (2015). Iontophoretic transdermal sampling of iohexol as a non-invasive tool to assess glomerular filtration rate. *Pharmaceutical Research*, 32(2), 590-603. [\[CrossRef\]](#)
44. Krafcikova, P., Silhan, J., Nencka, R., Boura, E. (2020). Structural analysis of the SARS-CoV-2 methyltransferase complex involved in RNA cap creation bound to sinefungin. *Nature Communications*, 11(1), 1-7. [\[CrossRef\]](#)
45. Chen, Y., Su, C., Ke, M., Jin, X., Xu, L., Zhang, Z., Wu, A., Sun, Y., Yang, Z., Tien, P. (2011). Biochemical and structural insights into the mechanisms of SARS coronavirus RNA ribose 2'-O-methylation by nsp16/nsp10 protein complex. *PLoS Pathog*, 7(10), e1002294. [\[CrossRef\]](#)
46. Ke, M., Chen, Y., Wu, A., Sun, Y., Su, C., Wu, H., Jin, X., Tao, J., Wang, Y., Ma, X. (2012). Short peptides derived from the interaction domain of SARS coronavirus nonstructural protein nsp10 can suppress the 2'-O-methyltransferase activity of nsp10/nsp16 complex. *Virus Research*, 167(2), 322-328. [\[CrossRef\]](#)

47. Rose, N. D., Regan, J. M. (2015). Changes in phosphorylation of adenosine phosphate and redox state of nicotinamide-adenine dinucleotide (phosphate) in *Geobacter sulfurreducens* in response to electron acceptor and anode potential variation. *Bioelectrochemistry*, 106, 213-220. [\[CrossRef\]](#)
48. Zhang, L., Li, L., Yan, L., Ming, Z., Jia, Z., Lou, Z., Rao, Z. (2018). Structural and biochemical characterization of endoribonuclease Nsp15 encoded by Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Virology*, 92(22), 1-16. [\[CrossRef\]](#)
49. Deng, X., Hackbart, M., Mettelman, R. C., O'Brien, A., Mielech, A. M., Yi, G., Kao, C. C., Baker, S. C. (2017). Coronavirus nonstructural protein 15 mediates evasion of dsRNA sensors and limits apoptosis in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(21), E4251-E4260. [\[CrossRef\]](#)



PATULİNİN KARACİĞER VE AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ *IN VITRO* ANTİTÜMÖR AKTİVİTESİ

IN VITRO ANTITUMOR ACTIVITY OF PATULIN ON LIVER AND LUNG CANCER CELL LINES

Hande YÜCE¹ , Neşe Başak TÜRKMEN¹ , Selinay ŞENKAL² , Dilan Aşkın ÖZEK³ ,
Ezgi BULUT² , Ayşegül DOĞAN² , Songül ÜNÜVAR^{1*} 

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

²Yeditepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendisliği, 34755, İstanbul, Türkiye

³Fırat Üniversitesi, Kovancılar Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri Bölümü, 23000, Elazığ, Türkiye

ÖZ

Amaç: Patulin, başta *Aspergillus* ve *Penicilium* olmak üzere bazı küf mantarları tarafından üretilen bir mikotoksin olup, hayvanlarda ve insanlarda mikotoksikozdan sorumludur. Patulinin antitümör aktivitesi hakkında hala çok ayrıntılı veriler bulunmamakla birlikte bazı raporlar hücrel apoptozu ve toksisiteyi indüklediğini göstermektedir. Bizim bu çalışmadaki amacımız patulinin insan karaciğer ve akciğer kanseri hücreleri üzerindeki antiproliferatif, antimigrasyon etkilerini ve apoptotik yollardaki gen ifadeleri üzerine etkisini belirlemektir.

Gereç ve Yöntem: Patulinin karaciğer ve akciğer kanserleri tedavisindeki etkinliğini belirlemek için HEP3B ve A549 hücre hatları kullanıldı. Hücre hatları, artan konsantrasyonlarda patuline (1, 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 μ M) maruz bırakıldı, ardından MTS testi, yara iyileşme testi ve RT-PCR deneyleri ile, hücre canlılığı, hücre göçü ve apoptoz belirlendi.

Sonuç ve Tartışma: Patulin her iki kanser hücre hattında da doza bağlı olarak hücre canlılığında ve hücre göçünde önemli bir azalmaya neden oldu. Ayrıca her iki hücre hattında da apoptozun indüksiyonunu teşvik etti. Sonuçlarımız patulinin insan karaciğer ve akciğer kanser hücrelerinde tümör büyümesini *in vitro* olarak önemli ölçüde azaltabileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: A549, apoptoz, HEP3B, kanser, mikotoksin, patulin.

ABSTRACT

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Songül Ünüvar
e-posta / e-mail: songul.unuvar@inonu.edu.tr, Tel. / Phone: +90 506 245 40 54

Objective: *Patulin is a mycotoxin produced by some molds, mainly Aspergillus and Penicillium, and is responsible for mycotoxicosis in animals and humans. Although there are still no detailed data on the antitumor activity of patulin, some reports indicate that it induces cellular apoptosis and toxicity. Our aim in this study is to determine the antiproliferative and antimigration effects of patulin on human liver and lung cancer cells and its effect on gene expressions in apoptotic pathways.*

Material and Method: *HEP3B and A549 cell lines were used to determine the efficacy of patulin in the treatment of liver and lung cancers. Cell lines were exposed to increasing concentrations of patulin (1, 2.5, 5, 10, 25, 50, and 100 µM), followed by determination of cell viability, cell migration, and apoptosis by MTS assay, wound healing assay, and RT-PCR assays.*

Result and Discussion: *Patulin caused a dose-dependent significant decrease in cell viability and cell migration in both cancer cell lines. It also promoted the induction of apoptosis in both cell lines. Our results showed that patulin can significantly reduce tumor growth in human liver and lung cancer cells in vitro.*

Keywords: *A549, apoptosis, cancer, HEP3B, mycotoxin, patulin*

GİRİŞ

Patulin (4-hydroxy-4H-furo-3,2-C-pyran-2(6H)-one), çeşitli küf mantarları, özellikle *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Byssoschlamys* tarafından üretilen toksik bir ikincil metabolittir [1]. Elma, elma suyu, elma şarabı, kompostolar ve küçük çocuklara yönelik elma püreleri gibi elma türevli ürünlerde en yaygın bulunan mikotoksindir. İnsanların patuline maruziyeti sonucu gözlenen immünolojik, nörolojik ve gastrointestinal hastalıklar nedeniyle birçok ülkede gıdalardaki kontaminasyon limitlerinin yasal düzenlemelerle belirlenmesine ihtiyaç duyulmuştur [2]. İnsanların yanı sıra patuline maruz kalmanın hayvanlarda ve bazı mikroorganizmalarda sülfidril gruplarına olan afinitesi nedeniyle immünotoksisite, genotoksisite, embriyotoksisite ve teratojeniteye neden olduğu gösterilmiştir [3]. Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu (IARC, International Agency for Research on Cancer) tarafından Grup III karsinogen olarak sınıflandırılmıştır [4]. Deney hayvanlarında toksisiteye neden olduğuna dair çalışmaların olmasının yanısıra, patulinin antikanser aktivitesi üzerine çalışmalar da mevcuttur [5]. Patulinin antikanser aktivitesini hangi mekanizmalar üzerinden, hangi dozlarda gerçekleştirdiği ve etkili olduğu kanser türleri net olarak bilinmemektedir. Ancak yapılan çalışmalarda reaktif oksijen radikalleri (ROS) ile ilgili mekanizmalarla hücrel apoptozu ve sitotoksisiteyi indüklediği öne sürülmüştür [6]. Patulin, elektrofilik özelliği nedeniyle RNA, glutatyon (GSH) ve proteinlerin sülfidril gruplarına kovalent bağlanmaktadır. Bunun sonucunda da GSH tüketimine, RNA ve protein sentezinin inhibisyonuna neden olmaktadır [7]. Bunların yanı sıra mitokondriyal apoptotik sinyal yollarını aktive ederek de sitotoksisiteye neden olmaktadır [8].

Kanser tedavisinde kullanılan güncel ilaçların nötropeni, immünsupresyon, infertilite, periferik nöropati, kalp, böbrek ve karaciğer hasarı gibi ciddi yan etkileri bulunmaktadır. Bu nedenle, araştırmacılar doğada bulunan bakteri veya mantar toksinlerinin kanser tedavisindeki etkinliğini araştırmaya odaklanmışlardır [5].

Patulinin insan hücre hatları, özellikle kanser hücreleri üzerindeki etkilerine dair çok az veri bulunmaktadır. Bu çalışmada, patulinin insan karaciğer ve akciğer kanseri hücreleri üzerindeki

antiproliferatif, antimigrasyon etkilerini ve apoptotik yollardaki gen ifadeleri üzerine etkisini belirlemeyi amaçladık. Çalışmamız, A549 ve HEP3B hücrelerinde farklı dozlarda patulin uygulamasından sonra apoptotik genlerin ilk defa analiz edilmesi bakımından bu alanda yapılacak yeni çalışmalara katkı sağlayacaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre Kültürü

İnsan karaciğer kanseri hücreleri (HEP3B), akciğer kanseri hücreleri (A549) ve sağlıklı fibroblast hücreleri (L929) Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) temin edildi. HEP3B ve A549 hücreleri 25 cm²'lik flasklarda, %10 fetal sıgır serumu, %1 penisilin/streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma Chemical Co.) kullanılarak, 37°C, %5 kısmi CO₂ basıncı ve nemli ortam içeren inkübatör içerisinde yetiştirildi. Hücreler, %0.25 tripsin-EDTA ile (TrypLE™ Express, Invitrogen, Carlsbad, CA) haftada 2-3 kez pasajlandı ve fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilen hücreler DMEM içinde istenen konsantrasyona yeniden süspansiyon edildi. Patulinin (Toronto Research Chemicals, Cas No: 149-29-1) stok solüsyonları dimetil sülfoksit (DMSO) içinde hazırlanarak, 1 µM, 2.5 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM konsantrasyonlara seyreltildi.

Sitotoksikite Deneyi

Hücrelerin yaşaması ve proliferasyonu, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS) testi ile kantitatif ve kolorimetrik olarak belirlendi. MTS testinin yapılması için HEP3B, A549 ve L929 hücreleri 96 kuyucuklu plakalar içerisinde 24 saat önceden 5000 hücre/kuyu olacak şekilde 100 µL besi ortamı içerisinde ekildi. 24 saat sonra patulin 1 µM, 2.5 µM, 5 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 inkübatör 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 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) mikropalak okuyucu ile (BioTek Instruments, Inc. Winooski, Vermont, ABD) 450 nm'de absorbanslar ölçülerek değerlendirildi. Patulinin her bir konsantrasyonu 4 tekrarlı çalışıldı. Elde edilen veriler aşağıda belirtilen formül kullanılarak her bir grup için hücre canlılığının %50 inhibe olduğu dozlar (IC₅₀) patulin uygulanmış olan hücrelerde belirlendi.

$$\% \text{ Hücre canlılık oranı} = (A_{\text{test}} - A_{\text{kör}} / A_{\text{kontrol}} - A_{\text{kör}}) \times 100 \text{ [9].}$$

Wound Healing (Yara İyileşme) Testi

12 kuyucuklu plaklara 1 ml içinde 10^3 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 1 µM, 2.5 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM konsantrasyonlarda patulin ile muamele edildi. Yara iyileşme oranı 0, 24 ve 48 saatlik inkübasyonlardan sonra ters ışık mikroskobu (SOPTOP ICX41, China) ile değerlendirildi [10].

Genlerin İfade Edilmesinin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile Ölçümü

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizleri için Bcl-2, Bax, Bcl-xl, c-myc, p53, PTEN ve MAPK primerleri Primer-BLAST yazılımı (Bethesda, MD, USA) ile dizayn edilip, Sentebiolab (Ankara, Türkiye) firması tarafından sentezlendi. β-Actin kontrol geni olarak kullanıldı. Toplam RNA Trizol solüsyonu (#T9424, Sigma, USA) kullanılarak izole edildikten sonra, iScprit cDNA sentez kiti (Bio-Rad, USA) kullanılarak izole edilen RNA örneklerinden cDNA sentez edildi. Gen anlatım analizleri SYBR Green (Biorad) metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Data analizleri Biorad PCR cihazı (Biorad CFX 96) ve Biorad CFX programı kullanılarak gerçekleştirildi ve sonuçlar GraphPad programı ile istatistiksel olarak analiz edilerek grafikler şeklinde hazırlandı [11].

Tablo 1. RT-PCR analizinde kullanılan primerlerin gen dizileri.

Gen	Gen Dizilimi
Bax	F 5' TTGGAGCAGCCGCCCCAGG 3' R 5' CGGCCCCAGTTGAAGTTGCC 3'
Bcl-2	F 5' AGAGCAACCCAATGCCCGC 3' R 5' CAACGAGGGGCCTGAGAGG 3'
PTEN	F 5' TCATGTGGCTGCCATTCAGTGC 3' R 5' TTGCCTCGGTGTAACAAGTACGC 3'
MAPK	F 5' AGGCTGTTCCCAAATGCT 3' R 5' CGTCACTCGGGTCGTAAT 3'
P53	F 5' ACGCTTCCCTGGATTGGCAGCC 3' R 5' CCATTGCTTGGGACGGCAAGGG 3'
Bcl-xl	F 5' GAACTCTTTCGGGATGGGGTA 3' R 5' CAGAACTACACCAGCCACAGTC 3'
c-myc	F 5' CGTCTCCACACATCAGCACAA 3' R 5' TCTTGGCAGCAGGATAGTCCTT 3'
β- Actin	F 5' GACAGGATGCAGAAGGAGATTACT 3' R 5' TGATCCACATCTGCTGGAAGGT 3'

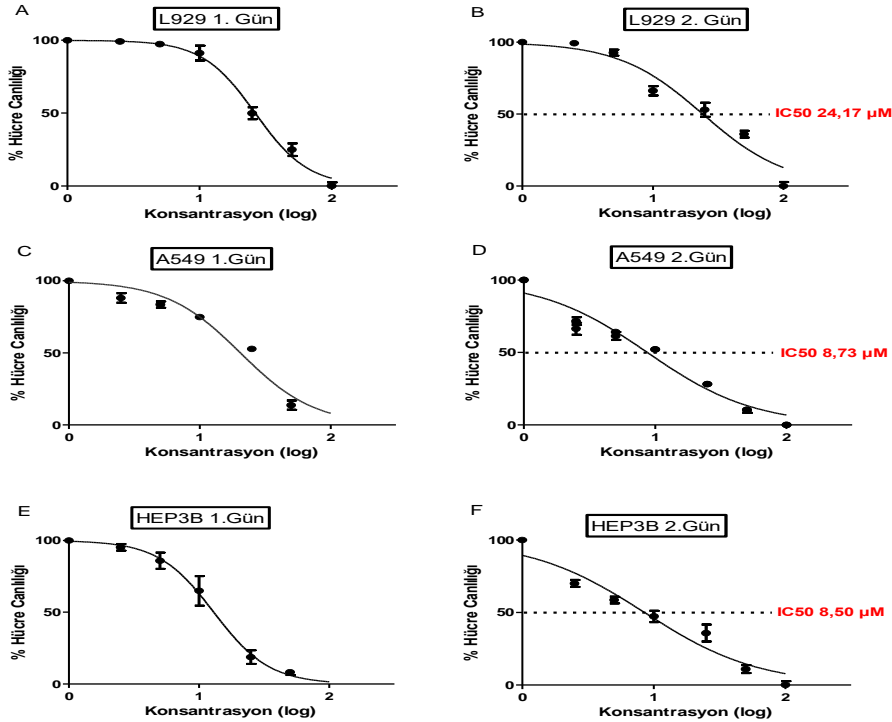
İstatistiksel Analiz

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 ve gen analiz sonuçları GraphPad Prism 8 programı kullanılarak hesaplandı. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

SONUÇ VE TARTIŞMA

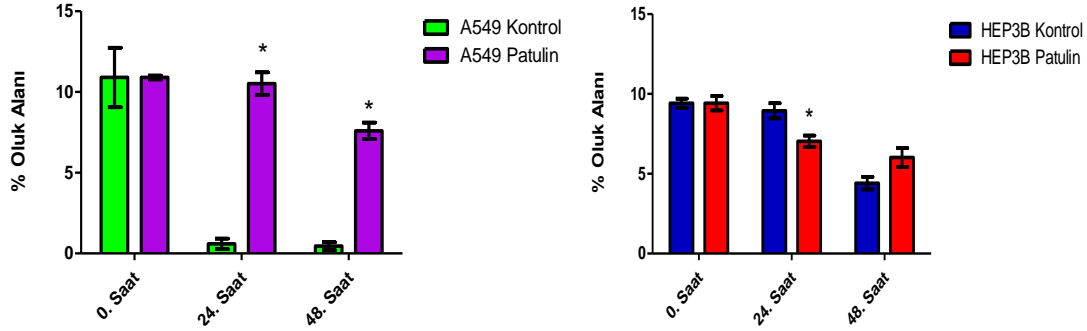
Patulinin farklı dozlarda uygulanmasından sonra HEP3B, A549 ve L929 hücreleri üzerindeki hücre canlılığı etkisi Şekil 1'de gösterildi. 24. saat verileri değerlendirildiğinde patulinin sağlıklı hücrelere (26.40 µM) kıyasla HEP3B hücreleri (12.98 µM) ve A549 hücreleri (20.47 µM) üzerinde daha düşük dozlarda hücre canlılığını inhibe ettiği bulundu. 48. saat verileri değerlendirildiğinde 24. saat verilerine benzer olarak, sağlıklı hücrelere (24.17 µM) kıyasla HEP3B hücreleri (8.50 µM) ve A549 hücreleri (8.73 µM) üzerinde daha düşük dozlarda hücre canlılığını inhibe ettiği bulundu. 24. ve 48. saatler karşılaştırıldığında patulinin, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etki gösterdiği gözlemlendi. HEP3B hücreleri üzerinde hem 24. hem de 48. saatte etkili bulundu. A549 hücreleri üzerinde zamana bağlı antiproliferatif etki gözlemlendi. Bu bakımdan patulinin HEP3B hücrelerinde hücre canlılığını daha çok etkilediği bulundu.



Şekil 1. Patulinin sağlıklı ve kanser hücre hatlarında 24. ve 48. saatlerdeki IC₅₀ değerleri.

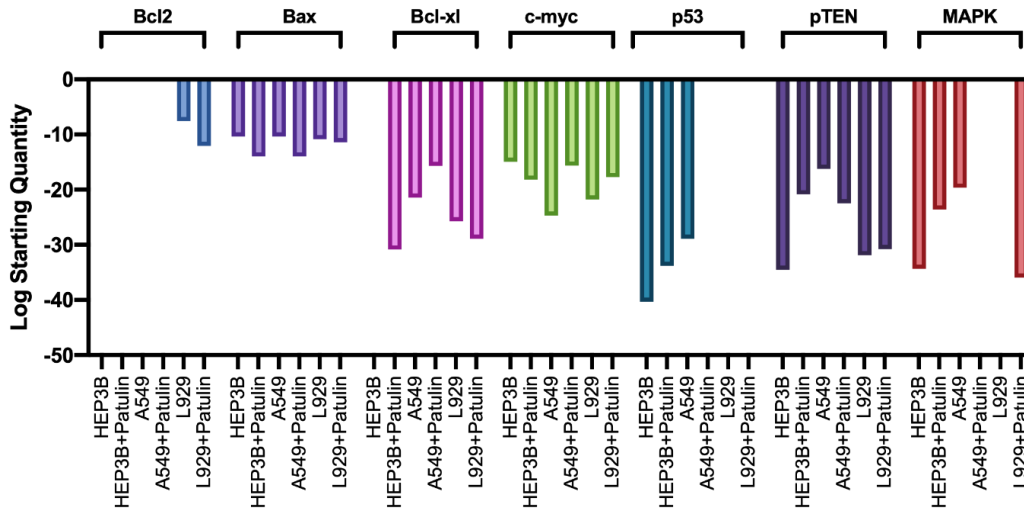
Patulinin hücre göçü üzerindeki etkisini belirlemek için yapılan yara iyileşme testinin sonuçları değerlendirildiğinde; ilk 24 ve 48 saatte açılan yarıkların en düşük düzeyde iyileştiği ve hücrelerin

migrasyon yeteneğinin kısıtlandığı görüldü. Yara kapanma testi sonuçları, patulin uygulamasının yara kapanmasını önemli ölçüde hızlandıran hücresel göçü iyileştirdiğini gösterdi (Şekil 2). 24. saatte patulinin sağlıklı hücelere kıyasla HEP3B hücreleri üzerine %21.4, A549 hücreleri üzerine %94.4 oranında hücrelerin göç kabiliyetini inhibe ettiği bulundu. 48. saatte ise hücre göçünü A549 hücreleri üzerinde %94.1 oranında inhibe etti. Ancak HEP3B hücrelerinde ise tam tersi sağlıklı hücelere kıyasla hücre migrasyonunda %36.5 oranında artış bulundu. Patulinin antimigrasyon etkisi A549 hücreleri üzerinde daha belirgin gözlemlendi.



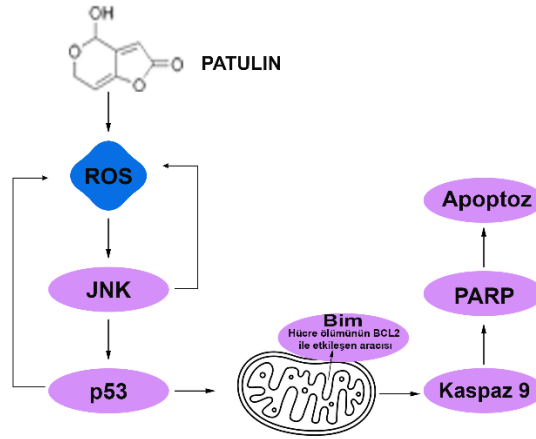
Şekil 2. Patulinin sağlıklı ve kanser hücre hatları üzerindeki antimigrasyon etkisi (* p<0.05)

Patulinin HEP3B, A549 ve L929 hücrelerindeki apoptotik ve proliferatif gen anlatım seviyeleri değerlendirildi. HEP3B hücrelerinde, patulin uygulaması Bax ve Bcl-xl gibi apoptotik belirteçlerin gen seviyesinde artışa neden oldu. c-myc, pTEN ve MAPK gibi proliferasyon ile ilişkili gen anlatımlarında ise azalmaya neden oldu. A549 hücrelerinde, patulin uygulaması hücrelerde pro-apoptotik Bax geninin anlatımında azalmaya sebep oldu. Aynı zamanda hücre çoğalma yolağını inhibe eden pTEN geninin ifadesinde de azalmaya sebep oldu. Sağlıklı hücrelerde, anti-apoptotik belirteç Bcl-2 gen seviyesinde düşüş gözlemlendi. pTEN gen anlatımında ise anlamlı olmayan bir artışa neden oldu. Bunun aksine, c-myc belirteci ile hücre proliferasyonu açısından önemli derecede bir artış gözlemlendi.



Şekil 3. Patulinin sağlıklı ve kanser hücrelerindeki RT-PCR sonuçları.

Patulin, *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Byssoschlamys* başta olmak üzere çeşitli mantarlar tarafından üretilen bir mikotoksindir [12]. Elmalarda ve elma esaslı ürünlerde kirletici olarak bulunur. Kontaminant olarak gıdalarda bulunması nedeniyle gıda güvenliği ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Son çalışmalarda patulinin kanser hücre hatlarında apoptoz indüksiyonu yoluyla güçlü antikanser aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [13]. Bu çalışmada, patulinin, HEP3B ve A549 hücreleri üzerindeki proapoptotik ve antimigrasyon aktivitesini değerlendirdik. Ayrıca p53 yolağını indükleme yeteneğini inceleyerek akciğer ve karaciğer kanseri tedavisinde aday bir molekül olabilirliliğine ışık tutmayı amaçladık (Şekil 4).



Şekil 4. Patulinin mitokondriyal stres yolu üzerindeki etkisi.

Son yıllarda patulin toksisitesi üzerine yapılan toksikolojik çalışmalarda bu mikotoksinin bağırsaklar, kalp ve böbrekler dahil olmak üzere birçok organı etkilediği öne sürülmüştür [2]. Patulinin memeli hücrelerinde, apoptozu aktive ettiği rapor edilmiştir. İnsan promyelositik lösemi hücrelerinde (HL-60) ROS oluşumu aracılığıyla apoptozu indüklemektedir. İnsan embriyonik böbrek hücrelerinde 293 (HEK293) ise mitojenle aktive olan protein kinazlardan (MAPK) p38 kinazın ve c-Jun N-terminal kinazın (JNK) fosforilasyonu aracılığıyla apoptozu indüklemektedir [14]. Yapılan diğer çalışmalarda ise patulinin ölümsüzleştirilmiş insan keratinosit hücreleri (HaCaT) [15], insan embriyonik böbrek 293 (HEK293) [14] hücreleri gibi insan hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. Çin hamsteri yumurtalık hücreleri (CHO-K1) [16], Çin hamster akciğer fibroblast hücreleri (V79) [17] ve kendiliğinden ölümsüzleştirilmiş sıçan granuloza hücreleri (SIGC) [18] gibi hayvan hücrelerinde de toksisiteye neden olduğu bulunmuştur. Daha önce araştırma ekibimiz tarafından yapılan bir çalışmada patulinin, kolon (HCT116) ve meme (MCF-7) kanseri hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda; nöroblastom (SH-SY5Y) hücrelerinde ise hem düşük hem de yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik aktivite gösterdiğini bulduk. Çalışma sonuçlarımıza dayanarak patulinin, uygun dozlarda nöroblastom, kolon ve meme kanserlerinin tedavisinde yeni bir aday molekül olabileceğini öne sürebiliriz [19]. Önceki in vivo çalışmalar, patulinin aktif dozları ile tedavi sonucu yan etkiler gözlemlendiğini

bildirmemiştir. Ancak yine de toksisitesinin farkında olunmalı ve dozlar buna göre uyarlanmalıdır [2,20]. Wu ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, insan promyelositik lösemi hücrelerinde (HL-60) en düşük hücre canlılığını ve en büyük morfolojik değişiklikleri patulinin 2.5 µM konsantrasyonda gösterdiği gözlenmiştir [21]. Bununla birlikte, Luft ve ark'nın [22] yaptığı bir çalışmada, periferik kan mononükleer hücrelerinin (PBMC) hücre canlılığının azalmasına daha düşük konsantrasyonda (0.6 µM) neden olduğu bildirilmiştir [14]. Bizim çalışma sonuçlarımız değerlendirildiğinde (Şekil 1), patulinin hem akciğer hem de karaciğer hücrelerinde hücre canlılığını benzer dozlarda (8.73 µM ve 8.50 µM, sırasıyla) azalttığını bulduk. Sonuçlarımız patulinin hücre canlılığını azalttığını öne süren bulgular ile uyumludur. Patulinin hücre göçü (Şekil 2) ile ilgili bulgularımızda ise akciğer hücreleri üzerinde daha belirgin antimigrasyon aktivite gösterdiğini gözlemledik.

Patulinin apoptoz ile ilişkisinin araştırıldığı çalışmalarda, farklı hücre hatlarında apoptozu indüklediği kanıtlanmıştır [14]. Wu ve ark. apoptozun, sitokrom c'nin sitozole salındığı ve parçalanmış kaspaz-9 seviyesinin yükseldiği Bcl-2 ailesi tarafından intrinsik yolda patulin tarafından başlatıldığını bildirmiştir [21]. Ayrıca, p38 kinazın aktivasyonu ve c-Jun N-terminal kinaz sinyali, HEK hücrelerinde patulin tarafından indüklenen apoptotik yollar olarak tanımlanmıştır [14]. İnsan serviks kanseri (HeLa) ve kolorektal kanseri (SW-48) hücre hatlarının patuline maruz kalmasının apoptozun indüklenmesine yol açtığı bulunmuştur. Apoptozun belirlendiği BrdU testinde tüm hücre hatları üzerinde en güçlü apoptotik etkinin 4 µM patulin konsantrasyonunda elde edilmiştir. Tüm hücre hatları arasında apoptoz oranının en yüksek HeLa hücrelerinde gözlendiği tespit edilmiştir [5]. Yapılan bir diğer çalışmada ise, bu mikotoksinin melanom hücrelerinde (B16F10) hücre proliferasyonu ve anti-tümör etkisi in vivo Balb/c farelerde değerlendirilmiştir. Araştırmacılar, 20 gün boyunca intraperitoneal patulin uygulamasının, B16F10 hücre implante edilmiş farelerde tümör gerilemesini önemli ölçüde indüklediğini gözlemiştir. Bu etki, p53 ve Bax ifadelerindeki artış, Bcl2 protein seviyelerinin aşağı regülasyonu ve kaspaz-3 aktivitesindeki artış ile desteklenen apoptozun aktivasyonu ile kanıtlanmıştır. Ayrıca, sistemik toksisite analizi, anemi, iltihaplanma ve karaciğer fonksiyon bozukluğu gözlenen melanom farelerinin aksine patulin uygulamasını takiben potansiyel bir toksisite olmadığı gözlenmiştir. Boussabbeh ve ark'nın yaptığı bu çalışma, patulinin in vivo modellerdeki terapötik etkinliğini gösteren ilk yayınlanmış rapordur [20].

p53; hücre döngüsü kontrol noktalarını, apoptozu ve DNA onarımını kontrol eden ilk tanımlanmış ve en iyi bilinen tümör baskılayıcıdır. p53'ün bu geleneksel işlevlerine ek olarak, giderek artan kanıtlar, p53'ün redoks dengesinin düzenlenmesinde de önemli bir rol oynadığını göstermektedir [23]. Zhou ve ark'nın yaptığı çalışmada, insan hepatoselüler karsinom (HepG2) hücrelerinde patulin ile indüklenen p53 protein birikimi gözlenmiştir. Bu durumun patulin ile indüklenen p53 aktivasyonunun DNA hasarına bir down-regülasyon yanıtı olduğu öne sürülmüştür. Bu sonuçlar, patulinin, muhtemelen oksidatif stres yoluyla HepG2 hücrelerinde DNA zinciri kopmalarına neden olduğunu göstermektedir.

Bu bilgilere dayanarak araştırmacılar p53 proteininin, patulin kaynaklı DNA hasarına karşı hücre sel savunmadan sorumlu bir protein olduğunu öne sürmektedirler [24]. Tümör baskılayıcı gen p53, kısmen mitokondriyal Bax ekspresyonunun yukarı regülasyonu yoluyla programlanmış hücre ölümünün aktivasyonuna aracılık eder. Bax, mitokondriyal stres yoluyla apoptoz için anahtar bir bileşendir. Bax, oligomerler oluşturur ve sitozolden mitokondriyal membrana yer değiştirir. Mitokondriyal membran üzerindeki por proteinleri ile etkileşimler yoluyla membran geçirgenliğini artırır. Bu da mitokondriden sitokrom c'nin salınmasına ve apoptozda önemli bir efektör olan kaspaz 3'ün aktivasyonuna yol açar [25].

Bizim çalışmamızda patulin uygulaması HEP3B hücrelerinde, Bcl-2 gen ailesi proteinleri olan Bax ve Bcl-xl gibi apoptotik belirteçlerin gen seviyesinde artışa sebep olmuştur. Bu proteinler apoptozun düzenlenmesinde belirleyici bir role sahiptir. Gen seviyelerindeki hücre ölümünü engeller ya da belirgin biçimde azaltır. Bunu genel apoptoz yolunu kapatarak yapar. Ayrıca patulin HEP3B hücrelerinde, c-myc, pTEN ve MAPK gibi proliferasyon ile ilişkili gen anlatımlarında azalmaya sebep oldu. Bunların inhibisyonu, hücrede normal apoptotik sürecin aktivasyonuna katkıda bulunabilir. A549 hücrelerinde, patulin uygulaması hücrelerde pro-apoptotik Bax geninin anlatımında azalmaya sebep oldu. Hücrenin apoptoza gidişi azalmıştır. Aynı zamanda hücre çoğalma yolağını inhibe eden pTEN geninin ifadesinde de azalmaya sebep oldu. Bu sonuçlar MTS testi sonuçları ile uyumlu bulundu. Sağlıklı hücrelerde ise, anti-apoptotik belirteç Bcl-2 gen seviyesinde düşüşe, pTEN gen anlatımında ise anlamlı olmayan bir artışa neden oldu. Bunun aksine, c-myc belirteci ile hücre proliferasyonu açısından önemli derecede bir artış gözlemlendi.

Mantar türleri genellikle kanser tedavisinde kullanılabilecek pekçok önemli metabolit üretirler. Çalışmamızda ve önceden yapılmış diğer çalışmalarda patulinin toksisite ve apoptoz indüksiyonu nedeniyle kanser önleyici bir aday olarak kabul edilebileceği öne sürülmüştür. Bu çalışmada patulinin karaciğer kanseri ve akciğer kanseri hücre hatlarında farklı konsantrasyonlardaki sitotoksik aktivitesi, hücre migrasyonu üzerindeki etkisi ve apoptoz ilişkili gen anlatım seviyelerindeki değişiklikler kontrol grubu (L929) ile karşılaştırıldı. Patulinin antitümöral aktivite gösterdiği tam olarak aydınlatılamamıştır. Literatür incelemeleri ve çalışmamız sonucunda patulinin antitümöral ajan olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Patulin ile akciğer kanseri hücre hatları arasındaki ilişkiyi inceleyen literatürler mevcuttur [14,26,27]. Monteillier ve ark. patulinin, Wnt yolunun inhibisyonu yoluyla insan akciğer adenokarsinom hücreleri (A549) üzerinde antiproliferatif ve antimigrasyon etkiler gösterdiğini bulmuşlardır. Bu veriler, akciğer kanseri tedavisinde patuline olan ilgiyi desteklemektedir. İnsanlarda tütünün neden olduğu akciğer kanserini taklit eden ve kimyasal olarak indüklenen akciğer karsinogenez modellerini kullanarak daha fazla in vivo deney yapılabilir. Böylece patulin ve akciğer kanseri arasındaki bilinmeyen yönler aydınlatılmış olur. Patulin türevleri üzerinde daha fazla araştırma yapılması, daha az toksisiteye sahip ilginç aktif bileşiklerin keşfedilmesine yol açabilir [26]. Beslenme

yoluyla patulin maruziyetine ek olarak, solunum yoluyla maruziyet te mümkündür. Akciğerde lokal etkilere neden olur. Solunan patulinin potansiyel lokal etkisini değerlendirmeye yönelik *in vitro* bir çalışma yapılmıştır. V79 hücre hattında patulinin de aralarında olduğu 14 farklı mikotoksinin sitotoksitesi belirlenmiştir. Yeterli miktarlarda bulunduğu, akciğer hücrelerinde göz ardı edilemeyecek lokal yan etkiler gözlenmiştir [27]. Akciğer kanseri hücre hatlarında yapılan çalışmalar bahsedilen bu çalışmalarla sınırlıdır. Karaciğer kanseri ile ilişkisi konusunda ise literatür verisine rastlanmamıştır. Çalışmamız karaciğer kanseri ile ilişkisi konusundaki ilk verileri sunmaktadır. Uygun dozlarda patulinin karaciğer ve akciğer kanseri tedavisi için aday bir molekül olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmada kullanılan kanser hücre dizilerinin insana özgü olması çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçların önemini artırmaktadır. Patulinin antikanser etki mekanizmalarını daha iyi anlamak için hem *in vitro* hem de *in vivo* daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TSG-2020-2087 numaralı İUBAP (İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi) tarafından desteklenmiştir.

YAZAR KATKILARI

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

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. Ismaiel, A.A., Papenbrock, J. (2017). Effect of patulin from *penicillium vulpinum* on the activity of glutathione-S-transferase and selected antioxidative enzymes in Maize. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(7), 825. [CrossRef]

2. Puel, O., Galtier, P., Oswald, I.P. (2010). Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins (Basel)*, 2(4), 613-631. [\[CrossRef\]](#)
3. Liu, B.H., Yu, F.Y., Wu, T.S., Li, S.Y., Su, M.C., Wang, M.C., Shih, S.M. (2003). Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 191(3), 255-63. [\[CrossRef\]](#)
4. IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. IARC; Lyon, France: 1986. Some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, Furocoumarins and Ultraviolet Radiation; pp. 83-98.
5. Abastabar, M., Akbari, A., Akhtari, J., Hedayati, M. T., Shokohi, T., Mehrad-Majd, H., Ghalehnoei, H., Ghasemi, S. (2017). In vitro antitumor activity of patulin on cervical and colorectal cancer cell lines. *Current Medical Mycology*, 3(1), 25-29. [\[CrossRef\]](#)
6. Boussabbeh, M., Ben Salem, I., Prola, A., Guilbert, A., Bacha, H., Abid-Essefi, S., Lemaire, C. (2015). Patulin induces apoptosis through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress pathway. *Toxicological Sciences*, 144(2), 328-337. [\[CrossRef\]](#)
7. Pal, S., Singh, N., Ansari, K. M. (2017). Toxicological effects of patulin mycotoxin on the mammalian system: an overview. *Toxicology Research*, 6(6), 764-771. [\[CrossRef\]](#)
8. Liu, J., Liu, Q., Han, J., Feng, J., Guo, T., Li, Z., Min, F., Jin, R., Peng, X. (2021). N-Acetylcysteine inhibits patulin-induced apoptosis by affecting ROS-mediated oxidative damage pathway. *Toxins*, 13(9), 595. [\[CrossRef\]](#)
9. 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. [\[CrossRef\]](#)
10. 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. [\[CrossRef\]](#)
11. Demirci, S., Doğan, A., Türkmen, N. B., Telci, D., Rizvanov, A. A., Şahin, F. (2017). Schiff base-Poloxamer P85 combination demonstrates chemotherapeutic effect on prostate cancer cells in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 86, 492-501. [\[CrossRef\]](#)
12. Andersen, B., Smedsgaard, J., Frisvad, J.C. (2004). *Penicillium expansum*: Consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(8), 2421-2428. [\[CrossRef\]](#)
13. Kwon, O., Soung, N. K., Thimmegowda, N. R., Jeong, S. J., Jang, J. H., Moon, D. O., Chung, J. K., Lee, K. S., Kwon, Y. T., Erikson, R. L., Ahn, J. S., Kim, B. Y. (2012). Patulin induces colorectal cancer cells apoptosis through EGR-1 dependent ATF3 up-regulation. *Cellular Signalling*, 24(4), 943-950. [\[CrossRef\]](#)
14. Liu, B. H., Wu, T. S., Yu, F. Y., Wang, C. H. (2006). Mycotoxin patulin activates the p38 kinase and JNK signaling pathways in human embryonic kidney cells. *Toxicological Sciences*, 89(2), 423-430. [\[CrossRef\]](#)

15. Guo, X., Dong, Y., Yin, S., Zhao, C., Huo, Y., Fan, L. (2013). Patulin induces pro-survival functions via autophagy inhibition and p62 accumulation. *Cell Death Disease*, 4(10), e822. [\[CrossRef\]](#)
16. Ferrer, E., Juan-García, A., Font, G., Ruiz, M. J. (2009). Reactive oxygen species induced by beauvericin, patulin and zearalenone in CHO-K1 cells. *Toxicology In Vitro*, 23(8), 1504-1509. [\[CrossRef\]](#)
17. Alves, I., Oliveira, N., Laires, A., Rodrigues, A., Rueff, J. (2000). Induction of micronuclei and chromosomal aberrations by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity. *Mutagenesis*, 15(3), 229-34. [\[CrossRef\]](#)
18. Burghardt, R. C., Barhoumi, R., Lewis, E. H., Bailey, R. H., Pyle, K. A., Clement, B. A., Phillips, T. D. (1992). Patulin-induced cellular toxicity: a vital fluorescence study. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 112(2), 235-244. [\[CrossRef\]](#)
19. Turkmen, N. B., Yuce, H., Ozek, D. A., Aslan, S., Yasar, S., Unuvar, S. (2021). Dose dependent cytotoxic activity of patulin on neuroblastoma, colon and breast cancer cell line. *Annals of Medical Research*, 28(9), 1767-1770. [\[CrossRef\]](#)
20. Boussabbeh, M., Ben Salem, I., Rjiba-Touati, K., Bouyahya, C., Neffati, F., Najjar, M. F., Bacha, H., Abid-Essefi, S. (2016). The potential effect of patulin on mice bearing melanoma cells: an anti-tumour or carcinogenic effect? *Tumour Biology*, 37(5), 6285-6295. [\[CrossRef\]](#)
21. Wu, T. S., Liao, Y. C., Yu, F. Y., Chang, C. H., Liu, B. H. (2008). Mechanism of patulin-induced apoptosis in human leukemia cells (HL-60). *Toxicology Letters*, 183(1-3), 105-111. [\[CrossRef\]](#)
22. Luft, P., Oostingh, G. J., Gruijthuijsen, Y., Horejs-Hoeck, J., Lehmann, I., Duschl, A. (2008). Patulin influences the expression of Th1/Th2 cytokines by activated peripheral blood mononuclear cells and T cells through depletion of intracellular glutathione. *Environmental Toxicology*, 23(1), 84-95. [\[CrossRef\]](#)
23. Jin, H., Yin, S., Song, X., Zhang, E., Fan, L., Hu, H. (2016). p53 activation contributes to patulin-induced nephrotoxicity via modulation of reactive oxygen species generation. *Scientific Reports*, 6, 24455. [\[CrossRef\]](#)
24. Zhou, S. M., Jiang, L. P., Geng, C. Y., Cao, J., & Zhong, L. F. (2010). Patulin-induced oxidative DNA damage and p53 modulation in HepG2 cells. *Toxicol*, 55(2-3), 390-395. [\[CrossRef\]](#)
25. Saxena, N., Ansari, K. M., Kumar, R., Dhawan, A., Dwivedi, P. D., Das, M. (2009). Patulin causes DNA damage leading to cell cycle arrest and apoptosis through modulation of Bax, p(53) and p(21/WAF1) proteins in skin of mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 234(2), 192-201. [\[CrossRef\]](#)
26. Monteillier, A., Allard, P. M., Gindro, K., Wolfender, J. L., Cuendet, M. (2018). Lung Cancer Chemopreventive Activity of Patulin Isolated from *Penicillium vulpinum*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(3), 636. [\[CrossRef\]](#)
27. Behm, C., Föllmann, W., Degen, G.H. (2012). Cytotoxic potency of mycotoxins in cultures of V79 lung fibroblast cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 75(19-20), 1226-31. [\[CrossRef\]](#)



DETERMINATION OF CHROMATOGRAPHIC PROTONATION CONSTANTS OF SOME IMIDAZOLE ANTIMYCOTIC DRUGS IN ACETONITRILE-WATER BINARY MIXTURES

*ASETONİTRİL-SU İKİLİ KARIŞIMLARINDA BAZI İMİDAZOL ANTİMİKOTİK İLAÇLARIN
KROMATOĞRAFİK PROTONASYON SABİTLERİNİN BELİRLENMESİ*

Hayrettin SEÇİLMİŞ¹ , Ebru ÇUBUK DEMİRALAY^{2*} , Kader POTURCU¹ 

¹Süleyman Demirel University, Faculty of Science and Literature, Department of Chemistry, 32260
Isparta, Turkey

²Süleyman Demirel University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, 32000,
Isparta, Turkey

ABSTRACT

Objective: *In this study, the thermodynamic protonation constant (s_pK_a) of antifungalazole derivative miconazole and tioconazole were investigated by the reversed-phase liquid chromatography (RPLC) method. Although classical stationary phases are the most commonly used column-packed materials in the analyses of these compounds by the RPLC method, the determination of the pK_a value of miconazole and tioconazole with a cyano-based column has not been reported so far.*

Material and Method: *Chromatographic behavior of the selected compounds was determined with Ultra Cyano column (Restek[®], 150×3.0 mm I.D, 3µm) which is compatible with hydrophobic compounds. The dependence of the retention times on the acetonitrile content of the mobile phase and the effect of the mobile phase pH on the chromatographic retention was determined for each compound by changing the pH in the range of 3.0-7.50.*

Result and Discussion: *The s_pK_a values were determined by a nonlinear regression program. The thermodynamic aqueous pK_a (w_pK_a) value of the studied compounds was calculated from the s_pK_a value by using the macroscopic parameters (dielectric constant and mole fraction) that play an important role in the solvent properties. The calculated w_pK_a values were compared with literature values.*

Keywords: *Combined effect, Imidazole, Nonlinear regression, RPLC*

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Ebru Çubuk Demiralay
e-posta / e-mail: ebrucubuk@sdu.edu.tr, Tel. / Phone: +905354935327

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada, antifungal azol türevi mikonazol ve tiokonazolün termodinamik protonasyon sabiti (${}^s pK_a$) ters faz sıvı kromatografisi (RPLC) yöntemi ile araştırılmıştır. Bu bileşiklerin RPLC yöntemi ile analizlerinde klasik sabit fazlar en yaygın olarak kullanılan kolon dolgulu malzemeler olmasına rağmen, siyano bazlı bir kolonla şimdiye kadar mikonazol ve tiokonazolün pK_a değerinin tayini rapor edilmemiştir.

Gereç ve Yöntem: Seçilen bileşiklerin kromatografik davranışları hidrofobik bileşiklerle uyumlu Ultra siyano kolon (Restek®, 150×3.0 mm I.D, 3µm) ile belirlenmiştir. Alıkonma sürelerinin mobil fazın asetonitril içeriğine bağlılığı ve mobil faz pH'nın kromatografik alıkonma üzerindeki etkisi, pH 3.0-7.50 aralığında değiştirilerek her bir bileşik için belirlenmiştir.

Sonuç ve Tartışma: ${}^s pK_a$ değerleri, doğrusal olmayan bir regresyon programı ile belirlenmiştir. Çalışılan bileşiklerin termodinamik suda pK_a (${}^w pK_a$) değeri, çözücü özelliklerinde önemli bir rol oynayan makroskopik parametreler (dielektrik sabiti ve mol fraksiyonu) kullanılarak ${}^s pK_a$ değerinden hesaplanmıştır. Hesaplanan ${}^w pK_a$ değerleri literatür değerleri ile karşılaştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Birleşik etki, İmidazol, Nonlineer regresyon, RPLC

INTRODUCTION

Worldwide, more than 150 million cases of serious fungal infections occur each year. About 1.7 million deaths occur due to these infections each year [1]. Azole antifungals are the most commonly used drug molecules in therapeutic applications [2]. These are synthetic compounds and generally classified as imidazoles or triazoles which include two or three nitrogen atoms, respectively, in the five-membered ring systems. Two important members of imidazole class are Miconazole (MICO) and Tioconazole (TIO) [3]. These antimycotic imidazole compounds have a broad spectrum of activity against different types of microorganisms [4,5]. Due to its non-polar chemical structure and low solubility in blood plasma, tioconazole is used only in skin infections. Miconazole is widely used in the treatment of dermal, oral, and vaginal mycosis [6].

The acid-base dissociation constant, typically represented as pK_a , is a very important physicochemical parameter to be aware of in pharmaceutical research and other fields including the discovery and evaluation of newly synthesized compounds. The 77.5% of the drug-like molecules that are involved in the WHO essential medicine list have ionizable functional groups with a pK_a in the range of 2-12 [7]. The neutral form of these drug molecules is generally water-insoluble, but highly membrane-permeable and lipophilic whereas ionizable forms are vice versa. Thus, lipophilicity, permeability, and solubility of drug molecules all can be influenced by their pK_a value [8]. Furthermore, this type of information can be valuable to evaluate the absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) properties of drug molecules [9,10].

Analytical methods used to determine pK_a values involve exposing a compound to a changing pH environment and monitoring the changes that occur due to the ionization state of the drug molecule [11]. Although potentiometric titration and spectrophotometric analyzes are routinely used for pK_a determination among these methods, these techniques have disadvantages such as poor solubility,

absence of UV chromophore, and different absorption spectra of neutral and ionized forms [12]. Reversed-phase liquid chromatography (RPLC) is the other preferred method to determine the pK_a value of ionizable substances. This method is based on the different retention behavior of the ionized and neutral forms of drug molecules [13,14]. Among the advantages of this method is its necessity for a very small amount of the analyte and high purity of the sample is not required for the LC assays [15].

In the analyzes performed in this method, the compound must be dissolved with a solvent. To eliminate the harmful effects of organic solvents, water is the first solvent preferred in the analysis. However, in cases the solubility of the compounds in water is insufficient, it is necessary to use an organic solvent-water binary mixture to dissolve the compound. On the other hand, in most of the analyses conducted in a 100% water environment with the RPLC method, problems such as non-repeating retention times (t_R), and phase precipitation are observed in the RPLC column [16]. For these reasons, it is necessary to add a small amount of organic modifiers to the mobile phase to eliminate these problems [17,18]. Acetonitrile (ACN) is the most preferred solvent among organic solvents. The determinations made using binary mixtures formed with water have excellent chromatographic properties [19,20]. The activity coefficients of molecular and ionic species in ACN-water mixtures can be calculated from the Debye-Hückel equation (Eq. 1) [21].

$$\log \gamma = \frac{-AI^{1/2}}{1 + a_o BI^{1/2}} \quad (\text{Eq. 1})$$

where the values of the Debye-Hückel A and B constants and the ion size parameter, a_o , in the acetonitrile-water mixtures have been reported by J. Barbosa et.al. [22]. The ionic strength, I, of the mobile phases used can be calculated for each pH value from charge and mass balances, taking into account the pK_{a1} and pK_{a2} values of phosphoric acid at each mobile phase composition, the analytical concentration of this acid in the mobile phase, the pH values and the activity coefficients, using iterative calculation [23].

When the literature is examined, the pK_a values of two imidazole drugs were determined by different computer programs [24], potentiometric titration [25], pH-metric method [10], capillary electrophoresis [26] and there is only one study aimed at determining the pK_a values with a liquid chromatographic method [27]. In this study, the retention behavior of MICO and TIO was investigated in the microheterogeneity region (30-45 v/v%) at 37°C. The thermodynamic pK_a ($^s pK_a$) values of these two compounds in ACN-water binary mixtures were determined by using the t_R value determined depending on the mobile phase pH change and the calculated activity coefficients in this region. The pK_a values ($^w pK_a$) in zero cosolvent concentration of these two poor water-insoluble compounds were

calculated by the mole fraction- ${}^s pK_a$ relationship and Yasuda-Shedlovsky (YS) extrapolation method. In addition, the degree of ionization of the related compound was calculated using the ${}^w pK_a$ values.

MATERIAL AND METHOD

Chemicals and Standard Solutions

All the analytical chemicals have not been subjected to any purification process. MICO and TIO were supplied from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Acetonitrile (ACN), o-phosphoric acid, potassium hydrogen phthalate (KHP), sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The TIO and MICO were prepared in ACN-water binary mixtures at a concentration of 50 µg/mL. These solutions were prepared daily and stored at +4°C.

Instrumentation and Apparatus

The Shimadzu HPLC system is integrated with an SPD-20A model UV-vis detector, a CTO-20A model column oven, an LC-20AD model pump, and a DGU-20A3 model degasser. Mettler Toledo InLab 413 Ag/AgCl glass electrode combined with a Mettler Toledo MA 235 pH/ion analyzer was used for pH measurements of RPLC. Potassium hydrogen phthalate (0.05 mol/kg) was chosen for electrode calibration in binary mixtures of ACN-water [28,29]. In adjusting the mobile phase pH, the temperature was kept constant at 25 °C. The ultrapure water purification process was carried out with the Direct Q3 UV system (Millipore-France).

Chromatographic Conditions

Experiments were carried out in different proportions of ACN-water binary mixtures (30:70; 35:65; 40:60; 45:55 v/v%) which include 25 mM orthophosphoric acid as a mobile phase component in this study. Due to the appropriate pK_a values (pK_{a1} , pK_{a2}) and buffering capacity, orthophosphoric acid is sufficient to adjust the mobile phase pH (${}^s pH$). The ${}^s pH$ from 3.0 to 7.5 is set by 1 M NaOH [30]. The separation was carried out in the Ultra Cyano column (Restek®, 150 × 3.0 mm I.D, 3 µm) at a constant temperature of 37 °C. In the HPLC system, the flow rate of the mobile phase was fixed at 0.6 mL/min. Analysis of the compounds with a UV-visible detector gave a maximum absorbance value of 204 nm. All retention data were obtained with three repeated analyses.

Evaluation of data

In this study, the ${}^s pK_a$ values of the TIO and MICO were calculated using the relationship between t_R and ${}^s pH$, taking into account the activity coefficients in the selected binary mixtures of ACN-water [22]. Data were calculated with the nonlinear regression (NLREG) program [31].

RESULT AND DISCUSSION

In the RPLC method, cyano columns allow the elution of hydrophobic compounds more quickly, using fewer organic solvents. In addition, it provides good selectivity for the determination of polar compounds and provides different selectivity than C18 and C8 columns. Cyano phase also shows enhanced retention of certain basic analytes relative to C18. In the literature, high concentration organic modifier and C18 columns are preferred for the separation of basic hydrophobic compounds in RPLC analyses [21,32]. The TIO and MICO selected in this study are also highly hydrophobic compounds ($\log P$: 6.11; $\log S$: -6.42 for TIO; $\log P$: 5.93; $\log S$: -6.26 for MICO) [33]. For the chromatographic analysis of these two drug molecules, the cyano column (Restek®) was preferred. In this study, the retention behavior of the studied compounds has been examined using different isocratic elution conditions on the selected RPLC column. The combined effects of pH and ACN percentage on the t_R values were investigated. Changes in retention time were determined by the changing of the pH and concentration of the selected organic modifier (ACN) in the mobile phase. All experiments were performed at least three times. The relative standard deviation is below 2%. A chromatogram showing the change of t_R value of MICO and TIO depending on the mobile phase pH change is given in Figure 1.

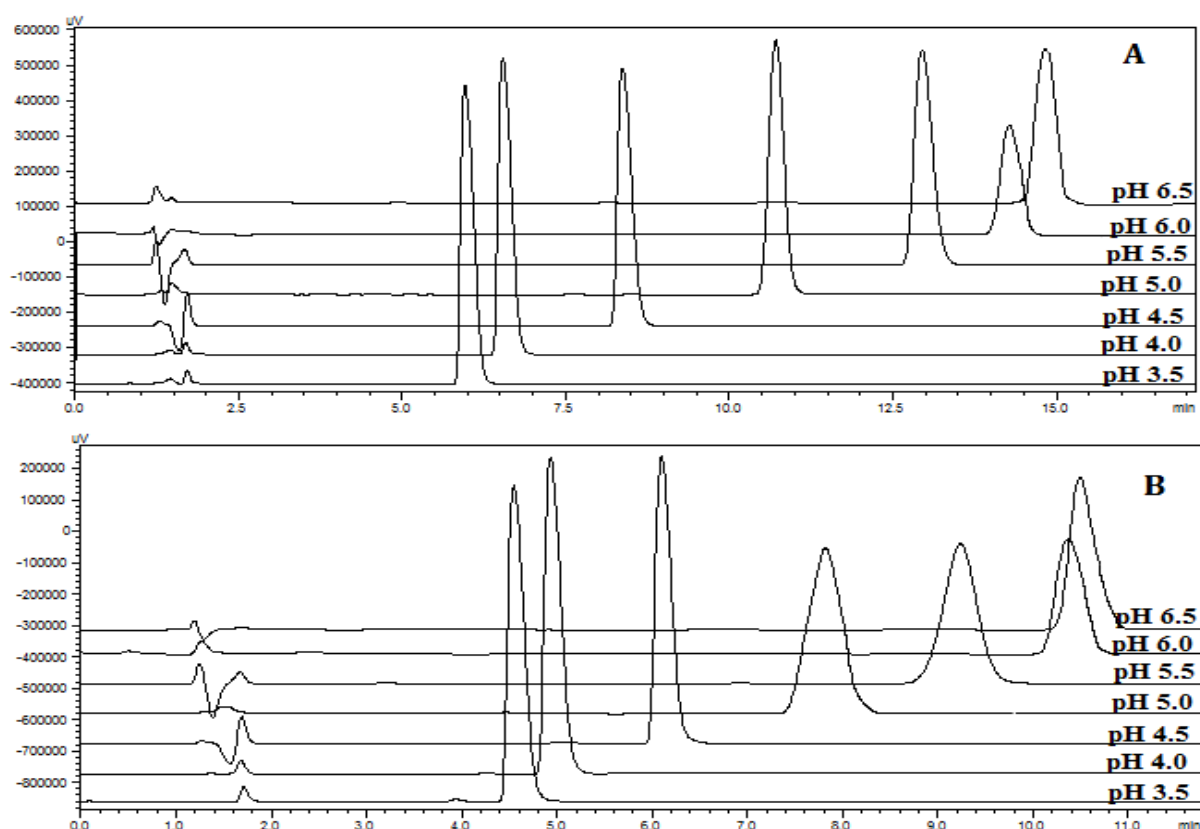


Figure 1. Overlaid RPLC chromatograms of ionized and molecular forms A) MICO B) TIO (ACN-water binary mixture containing 40 v/v% ACN)

The percentage of solvent, column temperature, and pH of the mobile phase are major factors to determine the retention time of ionizable molecules. The retention times were obtained over a pH range of 3.0-7.5, to determine pK_a of MICO and TIO using the RPLC method. In Figure 2, data pairs of $t_R/ \xi pH$ for investigated compounds in different percentages of acetonitrile-water binary mixtures are shown, together with the corresponding experimental and calculated retention times. The t_R values of the studied compounds are plotted as a function of the mobile phase pH using a nonlinear regression program (Figure 2).

In the calculations made in this program, the thermodynamic ξpK_a values were calculated by taking the activity coefficients into account. The ξpK_a value, the retention time of the molecular (t_{RB}), and ionized (t_{RBH^+}) form of the compounds were calculated by the NLREG program (Table 1). The activity coefficients of the ionic and molecular species in the studied hydro-organic mixtures were computed in each mobile phase and constant ionic strength with the Debye-Hückel equation [22].

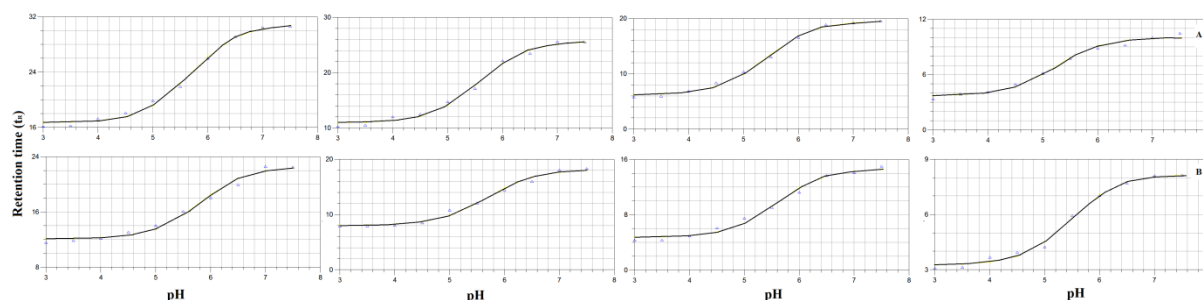


Figure 2. Plots of the retention times versus the pH of the mobile phase for A)30% B)35% C)40% D)45 v/v% ACN. The solid lines indicate the predicted retention times

Table 1. The thermodynamic pK_a values and the retention times of ionic and neutral species of the studied antifungal drugs

Compounds	ACN (v/v%)	pK_a	t_{RBH^+}	t_{RB}
Miconazole	30	5.684 (0.061)*	16.661 (0.274)	30.939 (0.371)
	35	5.553 (0.075)	10.892 (0.366)	25.661 (0.452)
	40	5.411 (0.058)	6.188 (0.270)	19.595 (0.302)
	45	5.227 (0.089)	3.690 (0.207)	10.021 (0.302)
Tioconazole	30	5.801 (0.098)*	12.121 (0.310)	22.566 (0.458)
	35	5.688 (0.094)	8.055 (0.300)	18.130 (0.408)
	40	5.584 (0.088)	4.718 (0.286)	14.672 (0.361)
	45	5.466 (0.067)	3.248 (0.112)	8.182 (0.130)

* standard deviation

MICO and TIO show basic retention behavior in RPLC and the experimentally determined ${}^s pK_a$ values belong to a nitrogen atom at position 3 (N3) in the imidazole ring. As the concentration of acetonitrile in the mobile phase increases, the ${}^s pK_a$ value of the compounds decreases. The pK_a values demonstrate the equilibrium between the positively charged, protonated nitrogen (N3) atom of the studied drug molecules and their neutral conjugate bases.

The ${}^s pK_a$ of the two hydrophobic antifungals were determined in studied binary mixtures since they are insoluble in water. Because of this, the thermodynamic aqueous pK_a (${}^w pK_a$) values at zero cosolvent concentration were computed by Yasuda-Shedlovsky (YS) extrapolation method. In this method, the calculated dielectric constant (ϵ) values in the studied ACN (v/v%) were used. The ϵ values at the different compositions of binary mixtures of ACN and water were obtained from Barbosa et al. [34]. The ${}^w pK_a$ values of these two antimycotic drugs were calculated by using the linear equations which were obtained by plotting ${}^s pK_a + \log[H_2O]$ data against $1/\epsilon$ values. The ${}^w pK_a$ values at zero cosolvent concentration are given in Table 2.

Table 2. The ${}^w pK_a$ value of the MICO (A) and TICO (B) by using the Yasuda-Shedlovsky extrapolation method and $X_{ACN}-{}^s pK_a$ relationship

Yasuda-Shedlovsky extrapolation method								$X_{ACN}-{}^s pK_a$ relationship	
Compounds	ACN (v/v%)	ϵ	$1/\epsilon$	$[H_2O]$	$\log[H_2O]$	pK_a	${}^s pK_a + \log[H_2O]$	Equation	r
Miconazole	30	62.220	0.0161	53.889	1.731	5.684	7.415	${}^s pK_a = -5.172X_{ACN} +$ 6.336	0.999
	35	60.230	0.0166	53.611	1.729	5.553	7.282		
	40	58.240	0.0172	53.333	1.727	5.411	7.138		
	45	56.250	0.0178	53.056	1.725	5.227	6.952		
	0	74.180				6.374			
Tioconazole	30	62.220	0.0161	53.889	1.731	5.801	7.532	${}^s pK_a = -3.781X_{ACN} +$ 6.269	0.999
	35	60.230	0.0166	53.611	1.729	5.688	7.417		
	40	58.240	0.0172	53.333	1.727	5.584	7.311		
	45	56.250	0.0178	53.056	1.725	5.466	7.191		
	0	74.180				6.296			

Figure 3, shows a straight line in all cases according to the YS plots. The slopes of the linear lines in the graphs are different from each other (Figure 3). Basic functional groups containing two drugs have negative slopes. These straight lines could be clarified by taking into account the structural features of ACN-water mixtures.

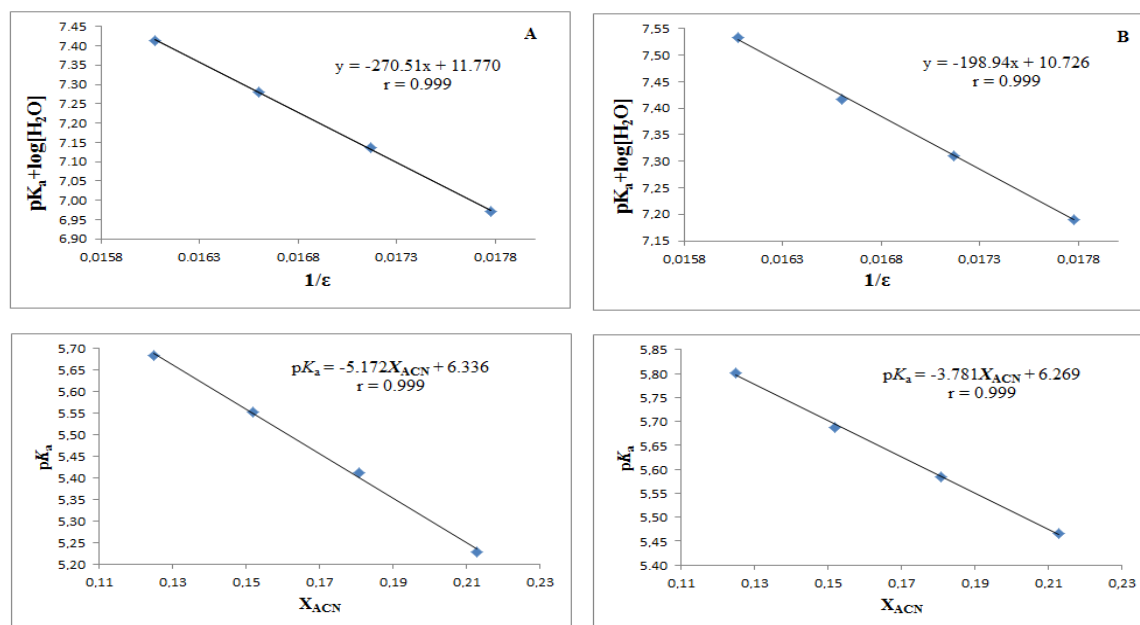


Figure 3. Yasuda-Shedlovsky extrapolation and $X_{ACN} - {}_s pK_a$ relationship

A negative slope is indicative of decreasing basicity with increasing organic solvent concentration in the mixture. Another approach to determine the ${}^w pK_a$ values of the compounds in the aqueous medium is to determine the mole fraction of the ACN - ${}_s pK_a$ relationship. The calculated ${}_s pK_a$ values in this study were plotted against the X_{ACN} value. The intercept value of the linear graph plotted using the $X_{ACN} - {}_s pK_a$ relationship gives the ${}^w pK_a$ value of the compound (Figure 3). The ${}^w pK_a$ values calculated by these two approaches are given in Table 2. The negative slope is due to the basic functional group of the compound. It is seen that the ${}^w pK_a$ values calculated using these two macroscopic constants are compatible with each other.

An active drug substance can cross the cell membrane in a non-ionized form. Therefore, the degree of ionization must be known. The degree of ionization is necessary for the determination of ADME properties and can be calculated using the Henderson-Hasselbach equation [35]. In this study, the studied compounds with the basic functional group, whose ${}^w pK_a$ value was determined, become 50% completely ionized at the ${}^w pK_a$ value of MICO and TIO. Molecular and anionic compounds were determined by using the % ionization values calculated in the pH 1.5-14 ranges (Figure 4). In basic compounds, two units above the pK_a value represent the non-ionized state of the compound.

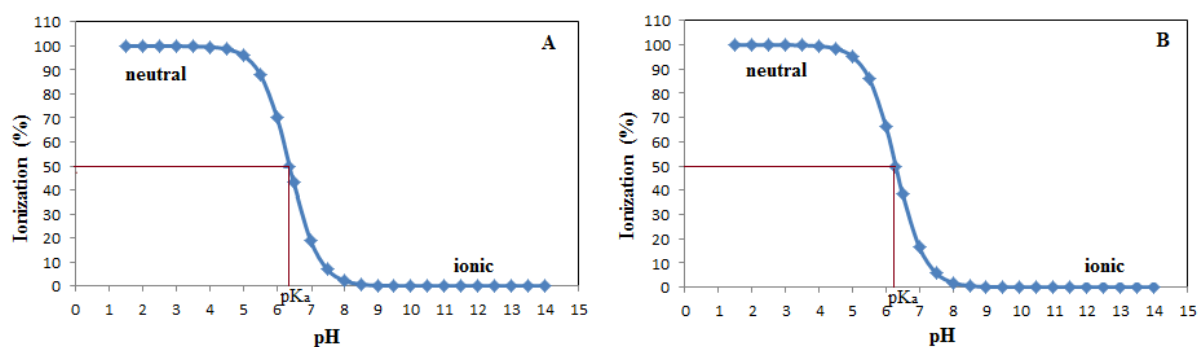


Figure 4. Percentage ionization of studied compound as a function of pH A) MICO, B) TIO

When the literature studies are examined, the experimental study (mostly for miconazole) is limited to determining the pK_a values of MICO and TIO. The pK_a values of the compounds were estimated using different computer programs [24,36]. According to the data obtained from these programs, pK_a values for these two compounds were calculated between 5.99-6.48 (Table 3). There is only one experimental study in which the pK_a value of tioconazole was determined. In this study performed with the RPLC method, the pK_a value of miconazole was also determined [27]. In this study, MICO and TIO were analyzed at 62.5%, 65%, and 70% ACN-water binary mixtures with X-Terra RP-18 column at 25 °C. High ACN concentration was used in the analysis of these two compounds by the RPLC method. In addition, a hybrid-based C18 column was preferred. In our study, MICO and TIO were analyzed with an HPLC column containing the cyano phase, showing different selectivity compared to C8 and C18 columns. Because this type of column was chosen, compounds could be determined with low ACN concentration. In the conducted study by Sanli et al. [27]. The pK_a value of MICO was determined by a potentiometric method in a binary mixture of methanol-water (50:50 v/v%) [25]. In a capillary electrophoresis study [26], the pK_a value of MICO was determined by the pressure-assisted capillary electrophoresis method in an aqueous solution with a pH range of 2.0 to 12.4 and an ionic strength of 0.05 M. (Table 3).

Table 3. pK_a values of studied compounds obtained from different methodologies.

Compounds	Computer programs	Literature values
TIO	6.48 [36]	7.10 [27]
MICO	5.99 [24], 6.48 [36]	6.16 [27], 6.91 [25], 6.63 [26], 6.07 [37]

The present study shows that the pH of the buffer and the percentage of acetonitrile in the mobile phase were two important parameters that affected the separation and chromatographic results. Most of the determinations of these hydrophobic antifungal compounds with low solubility by the RPLC method are carried out in high organic modifiers and C18, C8 columns. This study, which took place at 37 °C,

was performed both in the microheterogeneity region and in the cyano column. Since there is only one experimental data on tioconazole and a limited number of experimental data on miconazole, the thermodynamic data calculated with this study is the first in the literature. With this study, experimentally determined physicochemical parameter thermodynamic pK_a value will provide information about the transport process of the drug molecules through biological membranes and the advancement in the use of nanostructures for the drug transport mechanism.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Dr. Jose Luis Beltran (University of Barcelona) for kindly providing the NLREG 4.0 program.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: *H.S., E.Ç.D., K.P.*; Design: *E.Ç.D.*; Control: *E.Ç.D., K.P.*; Sources: *H.S., E.Ç.D., K.P.*; Materials: *H.S., K.P.*; Data Collection and/or processing: *H.S., K.P.*; Analysis and/or interpretation: *H.S.*; Literature review: *E.Ç.D., K.P.*; Manuscript writing: *E.Ç.D.*; Critical review: *H.S., E.Ç.D., K.P.*; Other: *H.S.*

CONFLICT OF INTEREST

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

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

The authors declare that this study does not include any experiments with human or animal subjects.

REFERENCES

1. Kainz, K., Bauer, M.A., Madeo, F. Carmona-Gutierrez, D. (2020). Fungal infections in humans: the silent crisis. *Microbial Cell*, 7(6), 143-145. [\[CrossRef\]](#)
2. Moraes, F., Bittencourt, S.F., Perissutti, E., Frecentese, F., Arruda, A.M.M., Shi Chen, L., Babadópulos, T., Nucci, G. (2014). Quantification of dapaconazole in human plasma using high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry: Application to a phase I study. *Journal of Chromatography B*, 958, 102-107. [\[CrossRef\]](#)

3. Shalini, K., Kumar, N., Drabu, S., Sharma, P.K. (2011). Advances in synthetic approach to and antifungal activity of triazoles. *Beilstein journal of organic chemistry*, 7, 668-677. [\[CrossRef\]](#)
4. Carrillo-Muñoz, A.J., Tur-Tur, C., Hernández-Molina, J.M., Santos, P., Cárdenes, D., Giusiano, G. (2010). Antifungal agents for onychomycoses. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27, 49-56. [\[CrossRef\]](#)
5. Piel, G., Evrard, B., Fillet, M., Llabres, G., Delattre, L. (1998). Development of a non-surfactant parenteral formulation of miconazole by the use of cyclodextrins. *International journal of pharmaceutical*, 169, 15-22. [\[CrossRef\]](#)
6. Zan, M.M., Cámara, M.S., Robles, J.C., Kergaravat, S.V., Goicoechea, H.C.(2009). Development and validation of a simple stability-indicating high performance liquid chromatographic method for the determination of miconazole nitrate in bulk and cream formulations. *Talanta*, 79, 762-767. [\[CrossRef\]](#)
7. Manallack, D. (2007). The pKa Distribution of Drugs: Application to Drug Discovery. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 1, 25-38. [\[CrossRef\]](#)
8. Avdeef, A. (2012). Absorption and Drug Development, Solubility, Permeability, and Charge State, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, p.31.
9. Box, K., Bevan, C., Comer, J., Hill, A., Allen, R., Reynolds, D. (2003). High-throughput measurement of pKa values in a mixed-buffer linear pH gradient system. *Analytical Chemistry*, 75, 883-892. [\[CrossRef\]](#)
10. Box, K., Comer, J. (2008). Using Measured pKa, LogP and Solubility to Investigate Supersaturation and Predict BCS Class. *Current drug metabolism*, 9, 869-878. [\[CrossRef\]](#)
11. Jelfs, S., Ertl, P., Selzer, P. (2007). Estimation of pKa for druglike compounds using semiempirical and information-based descriptors. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 47, 450-459. [\[CrossRef\]](#)
12. Babić, S., Horvat, A.J.M, Mutavdžić, P., Kaštelan-Macan, M. (2007). Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26, 1043-1061. [\[CrossRef\]](#)
13. Canals, I., Valkó, K., Bosch, E., Hill, A.P., Rosés, M. (2001). Retention of ionizable compounds on HPLC. 8. Influence of mobile-phase pH change on the chromatographic retention of acids and bases during gradient elution. *Analytical Chemistry*, 73, 4937-4945. [\[CrossRef\]](#)
14. Yılmaz, H., Üstün, Z., Çubuk Demiralay, E. (2016). RPLC determination of acid dissociation constants and quantitative estimation for sulfasalazine. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 13, 103-110. [\[CrossRef\]](#)

15. Manderscheid, M., Eichinger, T. (2003). Determination of pKa values by liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 41, 323-326. [[CrossRef](#)]
16. Bocian, S., Krzemińska, K. (2019). The Separations Using Pure Water as A Mobile Phase in Liquid Chromatography Using Polarembodied Stationary Phases, *Green chemistry letters and reviews*, 12(1), 69-78. [[CrossRef](#)]
17. Kazakevich, Y., Lobrutto, Y. (2007). HPLC for Pharmaceutical Scientists, Wiley-Interscience, USA, p.232.
18. Espinosa, S., Bosch, E., Rosés, M. (2002). Retention of ionizable compounds in high-performance liquid chromatography. IX. Modelling retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of pH and solvent composition with acetonitrile-water mobile phases. *Journal of Chromatography A*, 947(1), 47-58. [[CrossRef](#)]
19. Daldal, Y.D., Çubuk Demiralay, E. (2020). Chromatographic and UV-Visible Spectrophotometric pKa Determination of Some Purine Antimetabolites. *Journal of Molecular Liquids*, 317, 1-8. [[CrossRef](#)]
20. Bosch, E., Espinosa, S., Rosés, M. (1998). Retention of Ionizable Compounds on High-Performance Liquid Chromatography III. Variation of pKa Values of Acids And pH Values of Buffers in Acetonitrile-Water Mobile Phases. *Journal of Chromatography A*, 824, 137-146. [[CrossRef](#)]
21. Poole, C.F., Poole, S.K. (1991). Chromatography Today. Elsevier, Amsterdam, p.412.
22. +Barbosa, J., Bergés, R., Sanz-Nebot, V. (1998). Retention behaviour of quinolone derivatives in high-performance liquid chromatography: Effect of pH and evaluation of ionization constants, *Journal of Chromatography A*, 823(1-2), 411-422. [[CrossRef](#)]
23. Rosés, M., Bosch, E. (2002). Influence of mobile phase acid–base equilibria on the chromatographic behaviour of protolytic compounds. *Journal of Chromatography A*, 982(1), 1-30. [[CrossRef](#)]
24. Pallicer, J.M., Calvet, C., Port, A., Rosés, M., Ràfols, C., Bosch, E. (2012). Extension of the liquid chromatography/quantitative structure-property relationship method to assess the lipophilicity of neutral, acidic, basic and amphoteric drugs. *Journal of Chromatography A*, 1240, 113-122. [[CrossRef](#)]
25. Peeters, J. (1978). Determination of ionization constants in mixed aqueous solvents of varying composition by a single titration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67, 127-129. [[CrossRef](#)]
26. Miller, J.M., Blackburn, A.C., Shi, Y., Melzak, A.J., Ando, H.Y. (2002). Semi-empirical relationships between effective mobility, charge, and molecular weight of pharmaceuticals by pressure-assisted capillary electrophoresis: Applications in drug discovery. *Electrophoresis*, 23, 2833-2841. [[CrossRef](#)]

27. Şanlı, S., Başaran, F., Şanlı, N., Akmeşe, B., Bulduk, I. (2013). Determination of dissociation constants of some antifungal drugs by two different methods at 298 K. *Journal of Solution Chemistry*, 42, 1976-1987. [CrossRef]
28. Mussini, T., Covington, A.K., Longhi, P., Rondinini, S. (1985). Criteria for Standardization of pH Measurements in Organic Solvents and Water - Organic Solvent Mixtures of Moderate to High Permittivities. *Pure and Applied Chemistry*, 57(6), 865-876. [CrossRef]
29. Rondinini, S., Mussini, P.R., Mussini, T. (1987). Reference Value standards and Primary standards for pH Measurements in Organic Solvents and water - organic Solvent Mixtures of Moderate to High Permittivities. *Pure and Applied Chemistry*, 59, 1549-1560. [CrossRef]
30. Dolan, J.A. (2009). A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection. New York. [CrossRef]
31. Sherrod, P. H. Nonlinear Regression Analysis Program (NLREG) Version 4.0. Nashville, TN, USA. 1998. Accessed date 20.05.2021.
32. Marchand, D.H., Croes, K., Dolan, J.W., Snyder, L.R., Henry, R.A., Kallury, K.M.R., Waite, S., Carr, P.W. (2005). Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography. VIII. Phenylalkyl and fluoro-substituted columns. *Journal of Chromatography A*, 1062(1), 65-78. [CrossRef]
33. SwissADME program. <http://www.swissadme.ch/>. Accessed date 08.06.2020.
34. Barbosa, J., Sanz-Nebot, V. (1991). Autoprotolysis Constants and Standardization of the Glass Electrode in Acetonitrile-Water Mixtures. Effect of Solvent Composition. *Analytica Chimica Acta*, 244, 183-191. [CrossRef]
35. Tallarida, R.J., Murray, R.B. (1987). Henderson-Hasselbalch Equation. In: R.J. Tallarida, R.B. Murray (Eds.), *Manual of Pharmacologic Calculations*, (pp 74-75). New York: Springer.
36. <http://www.chemicalize.org>. Accessed date 20.07.2018.
37. Avdeef, A. (1993). Applications and Theory Guide to pH-Metric pKa and log P Measurement, Sirius Analytical Instruments Ltd. Forest Row, UK, p. 241.



COMPARISON OF THE PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN PEPPERMINT PLANT ACCORDING TO THE DRYING METHOD

KURUTMA YÖNTEMİNE GÖRE NANE BİTKİSİNİN FENOLİK İÇERİĞİNİN VE ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Ece MISER SALIHOĞLU^{1,*} , Bolkan SIMSEK¹ , Erdoğan ÇAYIR¹ , Sevgi AKAYDIN¹ 

¹Gazi University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, 06330, Etiler, Ankara, Turkey

ABSTRACT

Objective: Antioxidant activities of the plants were significantly affected by their drying methods. In the current study, total phenolic contents and antioxidant activity of aqueous extracts of peppermint (*Mentha piperita* L.) dried by two different methods, air-dried (AD) and freeze-dried (FD) were measured. The aim was to determine if there were any changes in the antioxidant activity according to the drying method.

Material and Method: In order to determine the total phenolic compounds and antioxidant capacity of air-dried (AD) and freeze-dried (FD) mint, were used Folin Ciocalteu, CUPRAC, DPPH, ABTS, DMPD methods.

Result and Discussion: Results were evaluated by comparing with the known antioxidant standards, such as gallic acid, trolox, ascorbic acid, and butylatedhydroxyanisole (BHA). The total phenolic contents (TPC) were calculated as 59.9 mg/g GAE for AD plant extract and 58.2 mg/g GAE for FD extract. According to the obtained results from all methods, radical scavenging activities were found to be slightly higher in AD samples than in FD samples. In conclusion, the results show that air-drying does not cause degradation in compounds that contribute to the antioxidant activity of the peppermint.

Keywords: Air-drying, antioxidant activity, freeze-drying, peppermint

ÖZ

Amaç: Bitkilerin antioksidan aktiviteleri kurutma yöntemlerinden önemli ölçüde etkilenir. Bu çalışmada, hava ile kurutulmuş (HK) ve dondurularak kurutulmuş (DK) nanenin (*Mentha piperita* L.) sulu ekstratlarında toplam fenolik içeriği ve antioksidan aktivitesi ölçülmüştür. Amaç, kurutma yöntemine göre antioksidan aktivitesinde değişiklik olup olmadığını belirlemektir.

Gereç ve Yöntem: Bu bitkilerin toplam fenolik bileşiklerini ve antioksidan kapasitelerini belirlemek için Folin-Ciocalteu, CUPRAC, DPPH, ABTS, DMPD yöntemleri kullanılmıştır.

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Ece Miser Salihoğlu
e-mail / e-posta: ecemiser@hotmail.com, **Phone / Tel.:** +312 202 31 54

Sonuç ve Tartışma: *Sonuçlar, gallik asit, trolox, askorbik asit ve butile hidroksianisol (BHA) gibi bilinen antioksidan standartlarla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Total fenolik madde içeriği (TFM), hava ile kurutulmuş bitki ekstresi için 59.91 mg/g GAE (Gallik asit eşdeğeri), liyofilize bitki ekstresi için 58.2 mg/g GAE olarak hesaplanmıştır. Tüm yöntemlerden elde edilen sonuçlara göre, HK örneklerinde radikal süpürme aktivitesinin DK örneklerinden biraz daha yüksek olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, havayla kurutmanın, nane nin antioksidan aktivitesine katkıda bulunan bileşiklerde bozulmaya neden olmadığı anlaşılmıştır.*

Anahtar Kelimeler: *Hava ile kurutma, antioksidan aktivite, dondurarak kurutma, nane*

INTRODUCTION

Peppermint (*Mentha piperita* L.) is one of the most widely used aromatic herbs. *Mentha piperita* L. is a hybrid species belonging to the Lamiaceae family and composed of two species, *Mentha aquatica* L. and *Mentha spicata* L. [1]. Peppermint has been used for a long time, both for therapeutic purposes and as flavoring agents. Several beneficial effects of peppermint include antioxidant, antitumor, antimicrobial, antibacterial, antimycotic, antiviral, antiallergenic, and immunomodulating actions [2-4]. It is used in the treatment of cold, headache, dysmenorrhea, gastrointestinal system disorders, and inflammation of the mouth, throat, sinuses, liver, bile duct, and intestines [5]. In addition, fresh and dried leaves of peppermint are widely used directly in meals, salads, drinks, or as aromatizing in various sauces.

Reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) are generated from exogenous and endogenous sources. Excessive and continuous ROS/RNS production leads to oxidative modification of lipids, proteins, and DNA bases, and stimulates many diseases, including cancer, cardiovascular diseases, diabetes mellitus, and inflammatory diseases. Natural antioxidants contained in plants protect cells from oxidative damage that may occur through reactive species and thus may have prophylactic effects against the risk of many diseases [7]. It has been reported that the antioxidant properties in plants are mostly due to phenolic compounds such as flavonoids, phenolic acids, and phenolic terpenes. Phenols give hydrogen ions (H⁺) from their hydroxyl group in the aromatic ring to prevent lipids and other macromolecules (nucleic acids, proteins, carbohydrates) from oxidative damage by reactive species [8].

Peppermint contains large amounts of different classes of phenolic compounds, including flavones, flavonols, flavanones, phenolic acids, terpenes, lignans, and stilbenes [9]. Several studies have reported that peppermint has antioxidant properties due to its phenolic compounds [10- 12].

Numerous *in vitro* methods have been developed to measure the antioxidant capacity in plant extracts. These methods have different test principles and experimental conditions, and thus the specific antioxidants in each method may have different contributions to the total antioxidant capacity [13]. It is claimed that the antioxidant activities of the plants were significantly affected by their drying methods [14].

Air-drying (AD) is a conventional and traditional method for drying of fruits and vegetables.

Several problems of air-drying, such as slow process, insect infestation, low quality in nutritional composition, and hygiene, have revealed the need to develop alternative drying methods [15,16]. Freeze-drying (FD) or lyophilization is the protection technique that takes place through a process called sublimation for the drying of the material [17]. The water contained in the sample is frozen first, and the iced water is removed by sublimation. The iced water evaporates directly in the low-pressure environment in the event of a slight increase in temperature. In this way, high temperatures are not needed for drying [18]. Due to low processing temperature and almost no oxygen during processing, freeze-drying/lyophilization does not change the molecular and cell structure of the materials and almost preserves their original state [19,20]. In lyophilization, the roasting effect caused by hot air in drying with hot air does not occur.

AD and FD are the most frequent use of drying methods, AD provides products which can have up to one year shelf life, while FD prevents spoilage and microbiological reactions as foods are dried under vacuum and at very low temperatures [14]. In this study was carried out to investigate which drying method has the better quality of the final product. For this purpose, we aimed to measure the total phenolic content and antioxidant capacity of peppermint in both AD and FD samples. We also aimed to compare antioxidant properties according to different *in vitro* methods, such as cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC), 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate free radical scavenging method (DPPH), 2, 2'-azinobis (3-ethyl benzothiazoline-6-sulphonic acid diammonium salt) (ABTS), and N,N-dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (DMPD) in the dried plants by using two different ways.

MATERIAL AND METHOD

Chemicals

1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) (Aldrich), N,N-dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (DMPD) (Fluka), ferric chloride (Aldrich), ammonium acetate (Fluka), 2, 2'-azinobis (3-ethyl benzothiazoline-6-sulphonic acid diammonium salt) (ABTS) (Sigma), ethanol (Merck), methanol (Merck), nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (Sigma), nitro blue tetrazolium chloride (NBT) (Sigma), phenazine methosulfate (PMS) (Sigma), Folin-Ciocalteu reagent (Sigma Aldrich), sodium carbonate (Na_2CO_3) (Sigma Aldrich), sodium hydroxide (NaOH) (Merck), copper (II) sulfate (CuSO_4) (Sigma,Aldrich), potassium sodium tartrate ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) (Sigma,Aldrich), dichloromethane (Sigma Aldrich), 2(3)-t-Butyl-4-hydroxyanisole, 2(3)-t-Butylhydroquinone monomethyl ether (BHA) (Aldrich), Trolox (Acros), L-Ascorbic acid (Vitamin C) (Sigma).

Plant Material and Drying Methods

The aerial parts of *Mentha x piperita* L. were collected from Ilgaz Mountain, Çankırı, Turkey, in May 2013. Botanical identification and authentication were conducted by Prof. Dr. Galip Akaydın from Hacettepe University. The plant materials were divided into two equal parts for drying processes. The first portion of fresh samples was dried at 27 °C of ambient air temperature for one week in the shadow. Mean relative humidity was 40-45%. The second portion of fresh peppermint was frozen at -80°C, then the frozen material was FD (lyophilized) under vacuum pressure at -55°C condenser temperature. The final vacuum pressure was 0.01 kPa. The air-drying process was continued until reaching a constant mass. FD was considered to be completed when a fixed pressure was reached. After drying, samples were weighed again, and mass loss of the sample was determined. It was found that AD samples weight were 0.1% lower than that of FD samples. Taking the differences between weights into account, an equal amount of samples were weighed.

Extraction was performed after air drying and FD (lyophilization) processes. Plant materials were pulverized in a grinder. One gram of the pulverized plant materials was extracted first with 15 mL of bidistilled water for 45 min, then added 5 mL of water and extracted for 45 min, at last added 5mL of water for 15 min at room temperature with a temperature-controlled ultrasonic bath. The extracts were filtered through pleated filter-paper and stored at -80 ° C.

Folin-Ciocalteu Method for the Total Phenolic Content

The amount of total soluble phenolics was determined according to the Folin-Ciocalteu method [21]. The assay method has been adapted to work with 96-well plates [22]. This method was applied to plants extracts (1000-500-250-125-62.5-31.25-15.625 µg/mL). To 100 µL of herb extract, 125 µL Lowry C was added. The mixture was mixed on a microplate shaker at 250 rpm. Then, 12.5 µL Folin reagent was added, and for stabilization, 30 min was allowed to turn blue in colour. The absorbance against a reagent blank was measured at 750 nm. The samples were prepared in triplicate for each analysis, and the mean value of absorbance was obtained. The same procedure was repeated for the standard solution of gallic acid, and the calibration line was construed. Based on the measured absorbance, the concentration of gallic acid equivalent is expressed in terms of (mg of Gallic acid (GA)/g of extract).

CUPRAC Assay

Cuprac assay is based on the reduction of Cu(II) to Cu(I) by antioxidants (reductants) which are present in the sample [23]. The method has been adapted for microplate analysis [22]. This method was applied to plants extracts (1000-500-250-125-62.5-31.25-15.625µg/mL). 50 µl CuCl₂ solution (10-2 M), 50 µL neocuproine alcoholic solution (7.5×10⁻³ M) and 50 µL NH₄Ac buffer solution, 27.5 µLsample,

and 27.5 µL water were added to wells. The mixture was then mixed well and incubated in the microwell strips at room temperature (18° to 25 °C) for about 30 min in dark. After that, absorbances of the reduced copper were measured against a reagent blank at 450 nm. The same procedure was repeated for the standard solutions.

DPPH Assay

The free radical scavenging activity of these plants was measured by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method [24] and adapted to work with 96 well plate [22]. With this method, it was possible to determine the antiradical power of an antioxidant by measuring the decrease in the absorbance of DPPH at 517 nm [24]. This method was applied to plant extracts (1000-500-250-125-62.5-31.25-15.625 µg/mL). First, 0.1 mM solution of DPPH in MeOH was prepared. Then, 50 µL of this solution was added to 150 µL of extracts of plants. The mixture was shaken vigorously and allowed to stand at room temperature for 30 min. Then the absorbance was measured at 517 nm in an ELISA reader. Lower absorbance of the reaction mixture indicated higher free radical scavenging activity [25]. The DPPH scavenging effect was calculated by using the following equation:

$$\text{DPPH Scavenging \%} = [\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}} / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100$$

ABTS Assay

ABTS assay [26] adapted for microplate analysis [22]. ABTS was dissolved in water to a 7 mM concentration. By allowing the mixture to stand in the dark at room temperature for 12-16 h before use, ABTS radical cation (ABTS[•]) was produced *via* the reaction of ABTS stock solution with 2.45 mM potassium persulphate (final concentration). The kept solution was diluted with 96% ethanolic at a ratio of 1: 30. This method was modified to work with 96 well plate and applied to plant extracts (1000-500-250-125-62.5-31.25-15.625 µg/mL). Respectively, x µL sample, 60 µL ABTS[•] and (240-x) µL solvent were added to wells. ABTS[•] solution was used as control (A₀). Then, the change in absorbance during 6 min was recorded and measured at 734 nm by an ELISA reader. The ABTS[•] scavenging effect was calculated by using the following equation:

$$\text{ABTS Scavenging \%} = [A_0 - A_1 / A_0] \times 100$$

DMPD Assay

DMPD assay [27] adapted for microplate analysis [22]. DMPD (100 mM) was prepared by dissolving 209 mg of DMPD in 10 mL of deionised water. This solution (1 mL) was added to 100 mL of 0.1 M acetate buffer, pH 5.25, and the colored radical cation (DMPD⁺) was obtained by adding 0.2 mL of a 0.05 M solution of ferric chloride (the final concentration was 0.01 mM). This solution (225 µL) was directly transferred to the microwell, and its absorbance at 505 nm was measured (A₀). This method was applied to plant extracts (1000-500-250-125-62.5-31.25-15.625 µg/mL). Samples (20 µL)

were added to all wells. Then 280 μL of DMPD^+ was added to all samples, and stirred, and left to stand for about 30 min in the dark. After this period, a decrease in absorbance was measured (A_1). The DMPD^+ solution was used as control. The DMPD^+ scavenging effect was calculated by using the following equation:

$$\text{DMPD Scavenging \%} = [A_0 - A_1 / A_0] \times 100$$

RESULT AND DISCUSSION

The antioxidant activities of the plants were significantly affected by their drying methods. Phenolic compounds such as flavonoids and phenolic acids have been identified as responsible for the antioxidant effects of plant products [28, 29].

Peppermint leaves contain large amounts of different classes of phenolics, including flavones (e.g., luteolin derivatives), flavonols (e.g., catechin, quercetin), flavanones (e.g., eriocitrin derivatives), phenolic acids (e.g., rosmarinic and caffeic acids), lignans and stilbenes, and some antioxidant vitamins, including carotenoids and ascorbic acid [9]. Due to being a frequently consumed plant and having a high content of antioxidant compounds, mint has been interesting for antioxidant activity studies.

In our study, the total phenolic contents were expressed as mg/g gallic acid equivalent using the standard curve equation ($y = 0.5585 \ln(x) - 1.3345$, $R^2 = 0.9815$), where y: absorbance at 750 nm, x: total phenols in the extracts (Figure 1). By applying the absorbance values obtained from the plant extracts to the regression equation, the phenolic substance contents were expressed as μg gallic acid equivalent (GAE) (Table 1).

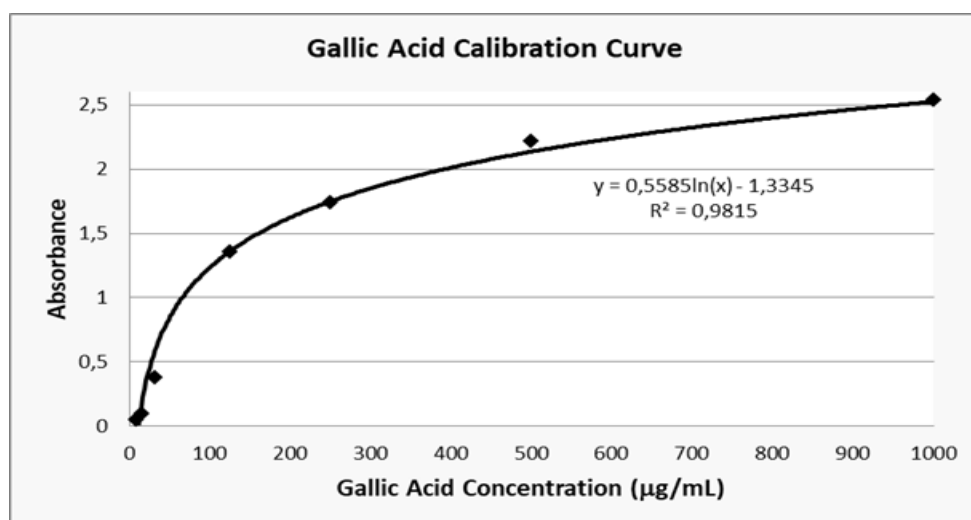


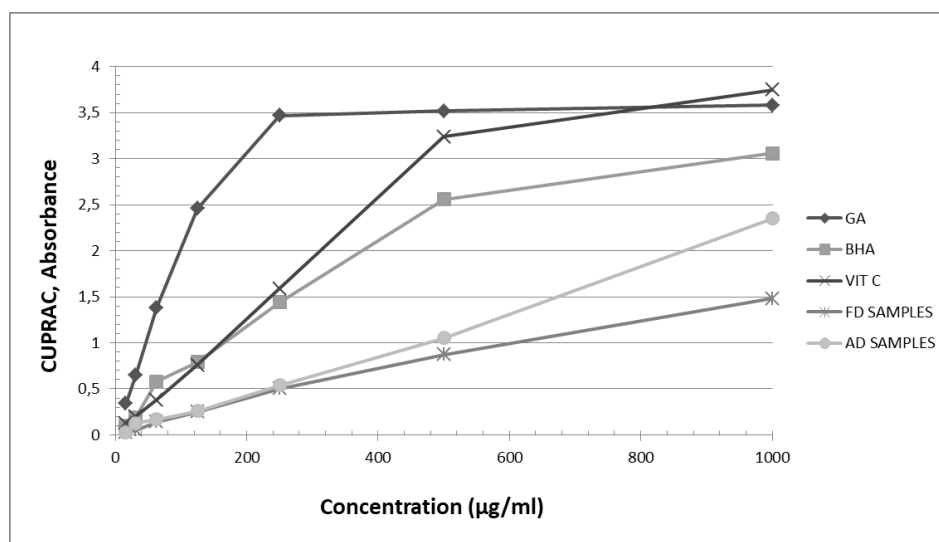
Figure 1. Standard calibration curve of Gallic Acid

Table 1. Total phenolic contents in aqueous extracts.

Aqueous extracts of <i>M. piperita</i>	Total phenolic content (mg GA/g) \pm SD	Aqueous extracts of <i>M. piperita</i>
Air-dried	58.20 \pm 2.34	Air-dried
Areeze-dried	59.91 \pm 24.97	Freeze-dried

No significant difference was observed between the total phenolic contents (TPC) values obtained according to the drying method. In a previous study, Papageorgiou et al. found lower total phenolic content in the FD samples rather than AD samples [30]. In another previous study, TPC was found as 75.31 ± 3.58 mg GAE g^{-1} for aqueous extract of leaf of *Mentha piperita* [31]. Uribe et al. obtained TPC values ranging from 11.56 to 24.4 mg/g GAE on vacuum-dried mint leaves and 12.43 mg/g GAE on fresh mint leaves [32]. Safaiee et al. found maximum TPC values of *Mentha aquatica* (0.2451 mg/g) by freeze-drying method and they suggested that in FD samples, phenolics could be better preserved in the substrate [33].

The CUPRAC method is based on the reduction of Cu(II), which is used as an oxidant, to Cu(I) by both hydrophilic and lipophilic antioxidant compounds present in the sample. GA, BHA, and vitamin C were used as standard solutions. According to the results of the CUPRAC study, peppermint samples had lower antioxidant capacity than those of all standard compounds. The AD and FD samples had similar absorbance values up to 500 μ g/mL, whereas the AD samples had higher values than the FD samples at the 1000 μ g/mL concentration (Figure 2).

**Figure 2.** The determined antioxidant activities of plant extracts by using CUPRAC method

In a recent study, Ferhat et al. studied the antioxidant activity in different extracts of *Mentha aquatica*. Similar to our results, they showed that AD samples of *Mentha aquatica* roots had lower

activity than the BHA standard [34]. We could not find any studies to compare our results according to the drying method.

DPPH assay is a rapid, simple, and widely used method which has been used to evaluate the antioxidant activity of plants. In this method, the antioxidant activity of a compound is determined by scavenging the DPPH radical as a hydrogen donor and is expressed as percent inhibition. Gallic acid, Trolox, BHA, and Vitamin C were used as the reference standards. In our study, we found that vitamin C had the highest activity in the DPPH radical scavenging. At the same time, we observed that AD samples had moderately higher DPPH radical-scavenging activity than FD samples at all concentrations (Figure 3). DPPH radical scavenging activity in AD samples was found to be higher than in FD samples, and both samples had lower antioxidant capacity than those of standard compounds.

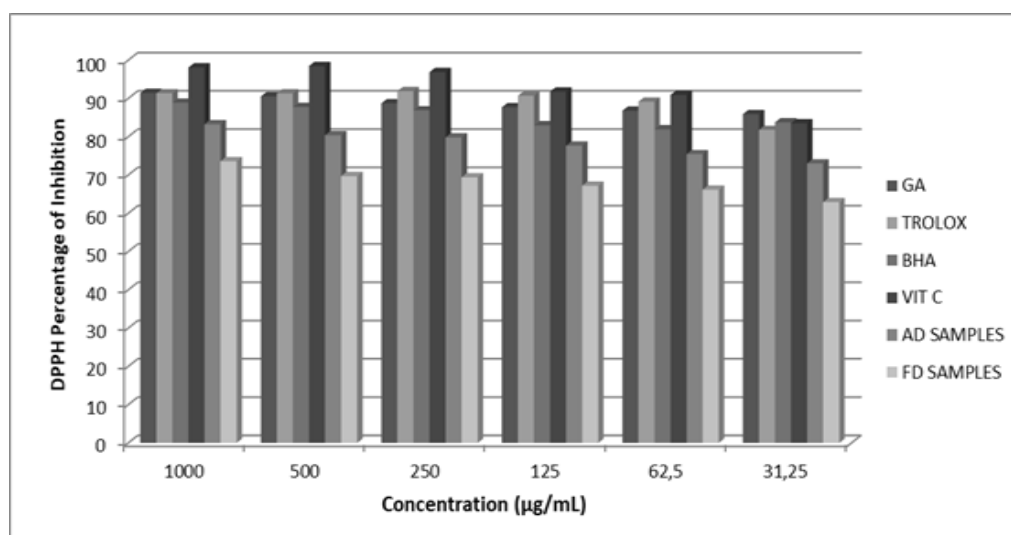


Figure 3. The ability of peppermint extracts to inhibit DPPH radical

Orphanides et al. found significantly higher phenolic content and DPPH radical-scavenging activity in FD samples of spearmint than those in AD samples [35]. According to DPPH antioxidant assay results, they reported that FD was the best effective drying method. In a previous study conducted with collected peppermint at different periods, DPPH radical scavenging activity was significantly lower in all of the FD materials than AD plant materials [30]. Studies showed that extraction yield and DPPH scavenging activity increased when the temperature is increased from 30 °C to 60 °C [33,36].

The ABTS method is based on the inhibition of the ABTS radical, which is formed during the reaction by a molecule with antioxidant activity. In this study, antioxidant activity was determined by decolorizing the blue-green ABTS radical cation with antioxidants in peppermint extracts. Gallic acid, Trolox, BHA, and Vitamin C were used as the reference standards. Although plant extracts had lower antioxidant capacity than those in all standard compounds until 500 µg/mL concentration, all antioxidant

capacities were similar at 1000 $\mu\text{g/mL}$. Taking the results of phenolic composition and ABTS assay in our study into consideration, although there was a slight difference (Figure 4), AD peppermint had higher ABTS radical scavenging activity than lyophilized peppermint.

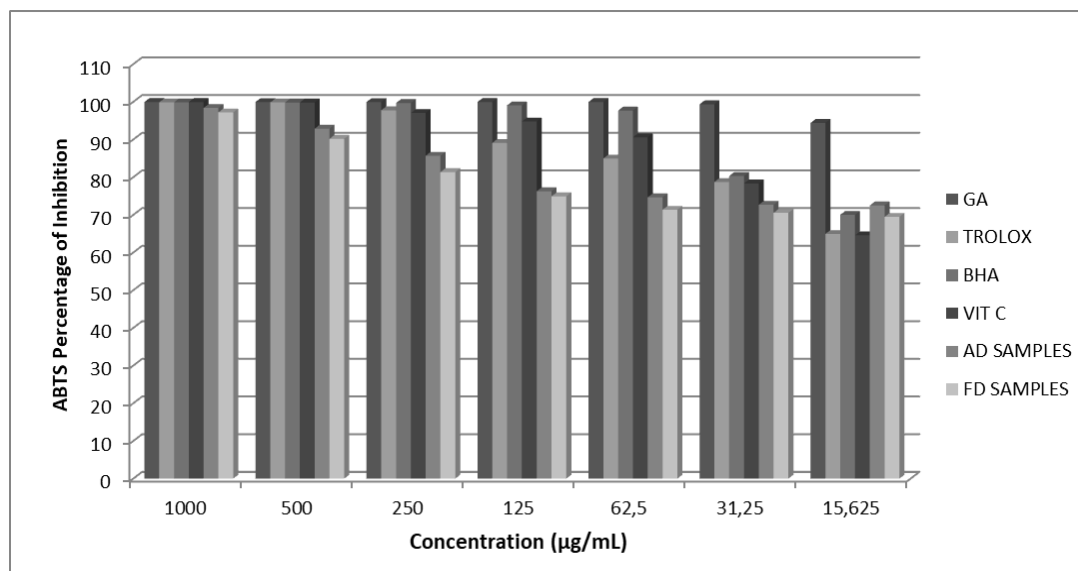


Figure 4. ABTS radical scavenging activity of the plant extracts

Similar results to ours were reported in AD *Mentha piperita* by Okmen et al. [37]. Previous studies have shown that the antioxidant activities of AD samples were significantly lower than in FD plant materials, and this is attributed to a decrease of the phenolic compounds in the plant extracts [35]. Antal et al. reported that when the convectively dried spearmint and lyophilized samples were compared, lyophilized samples were kept with more volatile component [38]. Also, Abascal et al. reported that air-drying preserved more volatiles compared with freeze-drying [39]. Additionally, in a study on the investigation of the antioxidant behavior of AD and FD aromatic plant materials, it was shown that the antioxidant activities of all the FD samples were significantly lower than AD plant materials [30].

The DMPD method has been applied to determine the antioxidant activity of hydrophilic compounds in peppermint extract. Gallic acid, Trolox, BHA, and Vitamin C were used as the reference standards. The antioxidant activity in mint extracts was calculated according to the inhibition percentage of the DMPD radical formed in the experimental environment. DMPD radical scavenging activity is found to be more effective in AD plant sample (Figure 5). DMPD radical scavenging effect is higher than BHA for each of the samples. Among standards, the highest DMPD radical scavenging activity was obtained with vitamin C, and the lowest with BHA.

A study on the influence of drying on the flavor quality of *Mentha spicata* showed that AD samples had a stronger mentholated aroma than FD samples, and they indicated that AD samples

released higher quantities of monoterpenes which had antioxidant properties [40].

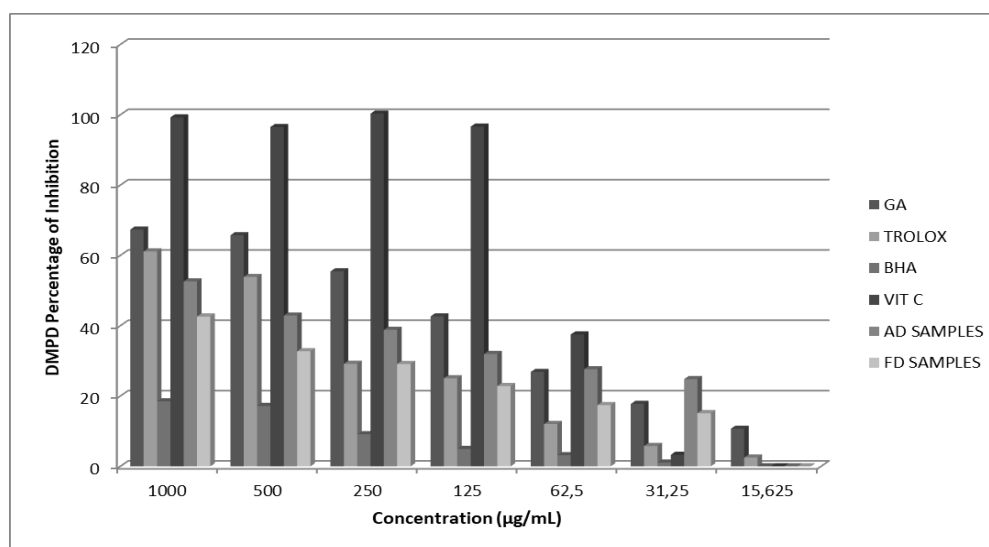


Figure 5. DMPD radical scavenging activity of the plant extracts

The results distribution suggested a good correlation between TPC and CUPRAC ($r = 0.995$, $p=0.0001$ and $r = 0.986$, $p=0.0001$ for FD and AD samples, respectively), ABTS radical-scavenging activity ($r = 0.954$, $p=0.001$ and $r = 0.948$, $p=0.001$ for FD and AD samples, respectively), DMPD radical-scavenging activity ($r = 0.950$, $p=0.001$ and $r = 0.941$, $p=0.002$ for FD and AD samples, respectively), and DPPH radical-scavenging activity ($r = 0.852$, $p=0.015$ and $r = 0.825$, $p=0.022$ for FD and AD samples, respectively). Similarly, positive correlations were also observed among the antioxidant activities obtained by different methods (data not shown). Correlations between polyphenol content and antioxidant capacity may suggest that the antioxidant activity of the peppermint may be related to the total phenolic content. Similar correlations obtained by both drying methods support the accuracy of our study results.

In conclusion, dried mint, both in Turkey and in the world, is a plant widely used in four seasons. However, it is an important question whether the nutritional values are preserved in dried samples or not. Air drying with/without sun, vacuum, and freeze-drying have been widely used for the drying process of plants. Since FD is carried out at very low temperatures, it is considered the best method for drying products that are sensitive to heat treatment. In addition, FD is a very good method to maintain the color, taste, aroma, and nutrient quality of the products. Lyophilized samples are suggested to be the closest to the fresh form of the plant. However, FD is an expensive preservation method and difficult to apply in daily life. The results of the current study showing that the AD version of the plant has a slightly higher antioxidant activity concluded that air-drying, most commonly used to extend the shelf life of the

peppermint, does not cause a degradation in compounds that contribute to its antioxidant activity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Prof. Dr. Galip AKAYDIN for Botanical identification and authentication. This study was supported by Gazi University Research Fund. Project Number: 02/2012-47.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that for this article they have no actual, potential or perceived conflict of interests.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

The authors declare that this study does not include any experiments with human or animal subjects.

REFERENCES

1. Dorman, H.J., Koşar, M., Başer, K.H., Hiltunen, R. (2009). Phenolic profile and antioxidant evaluation of *Mentha x piperita* L. (Peppermint) extracts. *Natural Product Communications*, 4(4), 535-542. [\[CrossRef\]](#)
2. Arumugam, P., Gayatri Priya, N., Subathra, M., Ramesh, A. (2008). Anti-inflammatory activity of four solvent fractions of ethanol extract of *Mentha spicata* L. investigated on acute and chronic inflammation induced rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26, 92–95. [\[CrossRef\]](#)
3. Abbaszadeh, B., Valadabadi, S.A., Farahani, H.A., Darvishi, H.H. (2009). Studying of essential oil variations in leaves of *Mentha* species. *African Journal of Plant Science*, 3(10), 217–221. [\[CrossRef\]](#)
4. Kunnumakkara, A.B., Chung, J.G., Koca, C., Dey, S. (2009). Molecular targets and therapeutic uses of spices, modern uses for ancient medicine. In B.B Aggarwal and A.B. Kunnumakkara

- (Eds.), *Mint and Its Constituents* (p. 373-401). T Singapore; Hackensack, NJ. World Scientific. ISBN 9789812837905 [\[CrossRef\]](#)
5. McKay, D.L., Blumberg, J.B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*, 20(8), 619-633. [\[CrossRef\]](#)
 6. Silva, B.A., Ferreres, F., Malva, J.O., Dias, A.C.P. (2005). Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chemistry*, 90, 157-167. [\[CrossRef\]](#)
 7. Pryor, W.A. (1991). The antioxidant nutrients and disease prevention--what do we know and what do we need to find out? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 391-393. [\[CrossRef\]](#)
 8. Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042. [\[CrossRef\]](#)
 9. Areias, F.M., Valentao, P., Andrade, P.B., Ferreres, F., Seabra, R.M. (2001). Phenolic fingerprint of peppermint leaves. *Food Chemistry*, 73, 307-311. [\[CrossRef\]](#)
 10. Zheng, W., Wang, S.Y. (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5165-5170. [\[CrossRef\]](#)
 11. Capecka, E., Mareczek, A., Leja, M. (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chemistry*, 93(2), 223-226. [\[CrossRef\]](#)
 12. Ertaş, A., Gören, A.C., Haşimi, N., Tolan, V., Kolak, U. (2015). Evaluation of antioxidant, cholinesterase inhibitory and antimicrobial properties of *Mentha longifolia* subsp. *noeana* and its secondary metabolites. *Records of Natural Products*, 9, 1105-1115. [\[CrossRef\]](#)
 13. Moharram, H.A., Youssef, M.M. (2014). Methods for determining the antioxidant activity: a review. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 11(1), 31-42. [\[CrossRef\]](#)
 14. Kamiloglu, S., Toydemir, G., Boyacioglu, D., Beekwilder, J., Hall, R.D., Capanoglu, E. (2016). A review on the effect of drying on antioxidant potential of fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(1), S110-129. [\[CrossRef\]](#)
 15. Karam, M.C., Petit, J., Zimmer, D., Baudelaire-Djantou, E., Scher, J. (2016). Effects of drying and grinding in production of fruit and vegetable powders: A review. *Journal of Food Engineering*, 188, 32-49. [\[CrossRef\]](#)
 16. Sagar, V.R., Suresh-Kumar, P. (2010). Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 47(1), 15-26. [\[CrossRef\]](#)
 17. Michalczyk, M., MacUra, R., Matuszak, I. (2009). The effect of air-drying, freeze-drying and storage on the quality and antioxidant activity of some selected berries. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33(1), 11-21. [\[CrossRef\]](#)
 18. Oikonomopoulou, V.P., Krokida, M.K. (2013). Novel aspects of formation of food structure during drying. *Drying Technology*, 31(9), 990-1007. [\[CrossRef\]](#)

19. Shang, H.M., Zhou, H.Z., Li, R., Duan, M.Y., Wu, H.X., Lou, Y.J. (2017). Extraction optimization and influences of drying methods on antioxidant activities of polysaccharide from cup plant (*Silphium perfoliatum* L.). *PLoS One*, 12(8), 1-18. [\[CrossRef\]](#)
20. Strumillo, C., Adamiec, J. (1996). Energy and quality aspects of food drying. *Drying Technology*, 14(2), 423-448. [\[CrossRef\]](#)
21. Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods Enzymology*, 299, 152–178. [\[CrossRef\]](#)
22. Miser Salihoglu, E., Akaydin, G., Caliskan Can, E., Yardim Akaydin, S. (2013). Evaluation of antioxidant activity of various herbal folk medicines. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 3(5),1-9. [\[CrossRef\]](#)
23. Apak, R., Güçlü, K., Ozyürek, M., Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981. [\[CrossRef\]](#)
24. Matthäus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3444-3452. [\[CrossRef\]](#)
25. Oktay, M., Gulcin, I., Kufrevioglu O.I. (2003). Determination of *in vitro* antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Food Science and Technology*, 36, 263-271. [\[CrossRef\]](#)
26. 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, 1231-1237. [\[CrossRef\]](#)
27. Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., Ritieni, A. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1035-1040. [\[CrossRef\]](#)
28. Govindarajan, R., Vijayakumar, M., Pushpangadan, P. (2005). Antioxidant approach to disease management and the role of ‘Rasayana’ herbs of Ayurveda. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 165-178. [\[CrossRef\]](#)
29. Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swaitsitang, P., Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes. *Food Chemistry*, 66, 401-436. [\[CrossRef\]](#)
30. Papageorgiou, V., Mallouchos, A., Komaitis, M. (2008). Investigation of the antioxidant behavior of air- and freeze dried aromatic plant materials in relation to their phenolic content and vegetative cycle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5743-5752. [\[CrossRef\]](#)
31. Oh, J., Jo, H., Cho, A.R., Kim, S.J., Han, J. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food Control*, 31, 403-409. [\[CrossRef\]](#)

32. Uribe, E., Marín, D., Vega-Gálvez, A., Quispe-Fuentes, I., Rodríguez, A. (2016). Assessment of vacuum-dried peppermint (*Mentha piperita* L.) as a source of natural antioxidants. *Food Chemistry*, 190, 559-565. [\[CrossRef\]](#)
33. Safaiee, P., Taghipour, A., Vahdatkhoram, F., Movagharnejad K. (2019). Extraction of phenolic compounds from *Mentha aquatica*: the effects of sonication time, temperature and drying method. *Chemical Papers*, 73, 3067–3073. [\[CrossRef\]](#)
34. Ferhat, M., Erol, E., Khadidja Aya Beladjila, Çetintaş, Y., Duru, M.E., Öztürk, M., Kabouche, A., Kabouche, Z. (2017). Antioxidant, anticholinesterase and antibacterial activities of *Stachys guyoniana* and *Mentha aquatica*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 324-329. [\[CrossRef\]](#)
35. Orphanides, A., Goulas, V., Gekas, V. (2013). Effect of drying method on the phenolic content and antioxidant capacity of spearmint. *Czech Journal of Food Sciences*, 31(5),509–513. [\[CrossRef\]](#)
36. Hayat, K. (2020). Impact of drying methods on the functional properties of peppermint (*Mentha piperita* L.) leaves. *Science Letters*, 8(1), 36-42. [\[CrossRef\]](#)
37. Okmen, A.S., Okmen, G., Arslan, A., Vurkun, M. (2017). Antibacterial activities of *Mentha piperita* L. extracts against bacteria isolated from soccer player’s shoes and its antioxidant activities. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(3), S163-S169. [\[CrossRef\]](#)
38. Antal, T., Figiel, A., Kerekes, B., Sikolya, L. (2011). Effect of drying methods on the quality of the essential oil of spearmint leaves (*Mentha spicata* L.). *Drying Technology*, 29, 1836–1844. [\[CrossRef\]](#)
39. Abascal, K., Ganora, L., Yarnell, E. (2005). The effect of freeze-drying and its implications for botanical medicine: A Review. *Phytotherapy Research*, 19(8), 655-660. [\[CrossRef\]](#)
40. Díaz-Maroto, M.C., Pérez-Coello, M.S., González-Viñas, M.A., Cabezudo, M.D. (2003). Influence of drying on the flavor quality of spearmint (*Mentha spicata* L.) M. CONSUELO. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1265–1269.



DENEYSEL DİYABETİN NEDEN OLDUĞU DEPRESYON TEDAVİSİNDE MİNOSİKLİN VE MİNOSİKLİN+METFORMİN KULLANIMI

EFFECT OF MINOCYCLINE AND MINOCYCLINE+METFORMIN ON EXPERIMENTAL DIABETES-RELATED DEPRESSION

Merve İNCİ ÇAMÇI^{1*} , Meral ERDİNÇ² , Emre UYAR³ , İlker KELLE² 

¹Dicle Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Ana Bilim Dalı, 21280, Diyarbakır, Türkiye

²Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı, 21280, Diyarbakır, Türkiye

³İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Ana Bilim Dalı, 44000, Malatya, Türkiye

ÖZ

Amaç: Minosiklin, santral sinir sistemine geçebilen, ikinci kuşak tetrasiklin grubu bir antibiyotiktir. Minosiklinin anti-inflamatuar, mikroglial aktivasyonu azaltma, anti-apoptotik, antioksidan özellikleri olduğu bilinmektedir. Son yıllarda diyabet ve depresyon arasında çift yönlü bir ilişki olduğunun ve fizyopatolojilerinde ortak yollardan birinin inflamasyon olduğunun ileri sürülmesi ile minosiklinin depresyon üzerine etkileri çalışılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada minosiklinin tek başına ve diyabet tedavisinde kullanılan metformin ile kombinasyonu şeklinde kullanımının, diyabet ile ilişkili depresyon üzerine etkilerinin ortaya konması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Farelerde insandakine benzer tip 2 diyabet modeli oluşturmak için 4 haftalık yüksek kalorili diyetin ardından ardışık beş gün, günde 1 defa streptozotosin (50mg/kg) uygulandı, uygulamadan 1 hafta sonra açlık kan glukoz düzeyi 200 mg/dl'nin üzerinde olan deneklerde diyabetin olduğu kabul edilip deneye dahil edildi. Streptozotosin (STZ) enjeksiyonundan iki hafta sonra minosiklin (40mg/kg), fluoksetin (20mg/kg) ve metformin (200mg/kg) 7 gün süre ile günde bir defa uygulandı. İlaç uygulamaları tamamlandıktan sonra; lokomotor aktivitenin belirlenmesi için açık alan testi, depresyon düzeyinin belirlenmesi için zorunlu yüzme testi yapıldı.

Sonuç ve Tartışma: Diyabetin ve uygulanan ilaçların lokomotor aktivitede anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı, minosiklin ve minosiklin-metformin kombinasyonunun ise depresyon tedavisinde en az fluoksetin kadar etkili olduğu sonucuna varıldı. Antidepresan etkinin kısa sürede başlamasının hastanın tedaviye uyuncu ve diyabetin prognozu açısından oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle de minosiklin uygulamasının gösterdiği antidepresan etki üzerine yapılan çalışmalar derinleştirilmeli, etkinin mekanizması araştırılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Depresyon, diyabet, minosiklin

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Merve İnci Çamçı
e-posta / e-mail: merveinci21@hotmail.com, Tel. / Phone: +905069394595

ABSTRACT

Objective: *Minocycline is a second-generation tetracycline group antibiotic that acts on the central nervous system. Minocycline reduces microglial activation and has anti-inflammatory, anti-apoptotic, and antioxidant properties. Recently, it has been proposed that there is a bidirectional relationship between diabetes and depression and that inflammation is one of the common pathways in their pathophysiology. The effects of minocycline on depression were then investigated. This study aimed to reveal the effects of minocycline alone or in combination with metformin, which is used in the treatment of diabetes, on diabetes-related depression.*

Material and Method: *For this purpose, to establish a human-like type 2 diabetes model in mice, streptozotocin (STZ) (50mg/kg) was administered once a day for five consecutive days after a 4-week high-fat diet. Animals with blood glucose levels ≥ 200 mg/dl were considered diabetic and employed in this experiment. Minocycline (40 mg/kg), fluoxetine (20 mg/kg), and metformin (200 mg/kg) were given once a day for 7 days two weeks after STZ injection. After the drug injections were completed, an open field test was used to determine locomotor activity and a forced swimming test was used to determine depression level.*

Result and Discussion: *It was concluded that diabetes and the drugs administered did not induce a significant change in locomotor activity, and that the minocycline and minocycline-metformin combination was at least as effective as fluoxetine in treating depression. It is recognized that the initiation of antidepressant effects in a short period is critical for patient adherence to therapy and diabetes prognosis. In conclusion, antidepressant-like effects of subchronic minocycline treatment appear to be potent as classical antidepressants. The mechanisms underlying minocycline's effects on mood should be broadly investigated to increase our understanding of depression and unveil potential novel therapies in depression management.*

Keywords: *Depression, diabetes, minocycline*

GİRİŞ

Diabetes mellitus; insülin üretimi ve salınımının, kısmi veya tamamen bozulmasından kaynaklanan, hiperglisemi ile karakterize metabolik bozukluk durumudur. Uluslararası diyabet federasyonu; diyabet hastalarının 2011 yılında 336 milyon kişi olduğunu ve 2030 yılında 552 milyona yükseleceğini tahmin etmektedir. Kronik hiperglisemi; bazı organlarda uzun süreli hasar ve disfonksiyon sonucunda nöropati, nefropati, retinopati, makro/mikro anjiyopati gibi diyabetik komplikasyonların ortaya çıkmasına sebep olur [1]. Bunun yanı sıra diyabet ve mental bozukluklar arasında sıkı bir ilişki olduğu da dikkat çekmekte [2], diyabetik hastalarda depresyon görülme riski ve sıklığı belirgin şekilde artmaktadır [3].Yapılan çalışmalarda, diyabet ve mental bozuklukların (depresyon, anksiyete, kognitif bozukluklar) aynı anda görülmesinin, ayrı ayrı görülme olasılığından iki kat fazla olduğu ortaya konmuştur [4].

Minosiklin; anti-oksidan, anti-inflamatuar, anti-apoptotik etkileri olan, kan beyin bariyerini aşarak santral sinir sisteminde etki gösterebilen, ikinci kuşak tetrasiklin grubu bir antibiyotiktir [5].

Metformin; insülin duyarlılığını arttıran, kan beyin bariyerini aşarak beynin birçok bölgesine dağılabilen, biguanid türevi antidiyabetik bir ilaçtır [6].

Diyabet ile birlikte seyreden psikiyatrik bozukluklar diyabetin prognozunu kötüleştirerek, hastaların yaşam kalitesini düşürüp mortalite riskinin artışına sebep olabilmektedir. Bu çalışmada tüm diyabetlilerin %90-95' ini oluşturan tip 2 diyabetlilerin, diyabete bağlı olarak gelişen

depresyonun tedavisi için minosiklin ve minosiklin-metformin kombinasyonunun etkisi mevcut tedavide kullanılan metformin ile ve depresyon tedavisinde kullanılan fluoksetin ile mukayese ederek ortaya konmuştur.

Çalışmamızda; mevcut ilaçlarla tedaviye dirençli depresyon tedavisi için denenen ve umut verici sonuçları olan minosiklinin; STZ ve yüksek kalorili diyet ile oluşturulan diyabet modeline bağlı oluşan davranışsal bozukluklar üzerine etkisi incelendi. Bu amaçla deneysel tip 2 diyabetin oluşturulmasının ardından açık alan testi ve zorunlu yüzme testi gerçekleştirildi.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kullanılan Deney Hayvanları

Deneyde, Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi (DÜSAM)' nden temin edilen 6-8 haftalık, 25-35 gram ağırlığında 64 adet erkek BALB/c fare kullanıldı. Hayvanlar, sabit oda sıcaklığında (22 ± 2 °C) ve standart laboratuvar koşullarında (12saat aydınlık/karanlık siklus), yeme/içme kısıtlaması olmaksızın, her kafeste 8 fare bulunacak şekilde barındırıldı. Hayvanlar deney protokollerinin başlangıcından 1 hafta önce, deneylerin gerçekleştirildiği DÜSAM-Tıbbi Farmakoloji Psikofarmakoloji Laboratuvarına getirildi. Deney protokolündeki tüm uygulamalar Avrupa Birliği Konseyi Direktifi 86 (24 Kasım 1986; 86/609/EEC) kurallarına göre ve Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (DÜHADEK, 2019-09)' ndan temin edilen etik onay çerçevesinde gerçekleştirildi. Deneye olası hayvan kayıpları göz önünde bulundurularak her grupta 8 hayvan bulunacak şekilde başlandı. Ancak diyabet oluşturmak için uygulanan STZ toksisitesi ve deney sürecinin uzunluğu gibi sebeplerle yaşanan hayvan kayıpları sonucunda literatür ile uyumlu olarak gruplarda 6-8 hayvan kaldı [7].

Çalışma Dizayını

Çalışmamızda kullanılan minosiklin (Sigma Aldrich-M9511), fluoksetin (Sigma Aldrich-F132) ve metformin (Sigma Aldrich-PHR 1084) %0.9 salin çözeltisinde, STZ (Sigma Aldrich- S0130) ise pH:4.5 olan 0.1 M sodyum sitrat tamponunda çözülerek deneklere 0.1 ml/10g hacminde, intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı. Daha önce yapılan bir çalışma ile benzer biçimde diyabet modeli oluşturulan tüm gruplara 4 haftalık yüksek kalorili diyet ile beslenmenin (D12492-Research Diets, %60 kCal yağ içerikli diet) ardından 5 gün, günde 1 defa 50mg/kg dozunda STZ uygulanırken, diyabet oluşturulmayan gruplara 5 gün, günde 1 defa sodyum sitrat çözeltisi verildi [7]. STZ enjeksiyonunu takiben 72 saat sonra gelişebilecek hipoglisemiye önlemek için %5' lik glukoz çözeltisi verildi ve enjeksiyonlardan 1 hafta sonra diyabetin oluşup oluşmadığı açlık kan glukoz (AKG) düzeyi ölçümü ile kontrol edildi. $AKG > 200 \text{mg/dl}$ olan tüm deneklerde diyabetin oluştuğu kabul edildi. Takip eden günlerde de diyabet

oluşturulan gruplar, yüksek kalorili diyet ile beslenmeye devam edildi. STZ enjeksiyonundan 2 hafta sonra 7 gün boyunca günde 1 defa minosiklin (40 mg/kg, i.p.), metformin (200 mg/kg, i.p.), fluoksetin (20 mg/kg, i.p.) uygulandı. Kontrol grubuna enjeksiyondan kaynaklanan stresi eşitlemek maksadı ile salin çözeltisi enjekte edildi. Tüm enjeksiyonlar her gün aynı saatlerde yapıldı. Kullanılan tüm ilaçların dozları yapılan önceki çalışmalara göre belirlendi [8-10]. Çalışmamızda deneklerin ağırlık değişimini ortaya koymak için tüm deney protokolü boyunca haftalık kilo takibi ve AKG düzeyi takibi yapıldı. Buna göre; 1. ölçüm deney başlangıcındaki ölçümü, 2. ölçüm 4 haftalık yüksek kalorili diyet ile beslenme sonrası alınan ölçümü, 3. ölçüm STZ enjeksiyonlarının bitiminden 1 hafta sonra yapılan ölçümü, 4. ölçüm tüm deney prosesinin tamamlanmasından sonra sakrifikasyon öncesi alınan ölçümü ifade etmektedir. Tüm ilaç enjeksiyonları tamamlandıktan sonra denekler açık alan testi ve zorunlu yüzme testine tabi tutuldu. Çalışmanın sonunda HbA1c değeri ölçümü yapıldı.

Tablo 1. Çalışma Dizaynı.

	Gruplar		1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta	5 gün	6. hafta	7. hafta	8. hafta
1	Kontrol	KONTROL								
2	Tip 2 Diyabet	DM	*	*	*	*	*	*	*	*
3	Tip 2 Diyabet + Minosiklin	DM+MİN	*	*	*	*	*	*	*	*
4	Tip 2 Diyabet + Fluoksetin	DM+FLU	*	*	*	*	*	*	*	*
5	Tip 2 Diyabet + Metformin	DM+MET	*	*	*	*	*	*	*	*
6	Tip 2 Diyabet + Metformin + Minosiklin	DM+MET+MİN	*	*	*	*	*	*	*	*
7	Minosiklin	MİN								
8	Metformin	MET								

Uygulamalar		
Yüksek Kalorili Diyet	Ad libitum	*
Sodyum Sitrata Çözeltisi		
%0.9 Salin		
Minosiklin	40 mg/kg, i.p (7 gün, günde 1 defa)	
Metformin	200 mg/kg, i.p.(7 gün, günde 1 defa)	
Fluoksetin	20 mg/kg, i.p.(7 gün, günde 1 defa)	
STZ	50mg/ kg, i.p(5 gün, günde 1 defa)	

Açık alan testi

Açık alan testi düzeneği her bir kenarı 42 cm, yüksekliği 30 cm olan kare şeklinde, tüm zeminleri siyah renkli bir düzeneştir. Denekler düzeneğe birer birer bırakılıp hareketleri 5 dk boyunca

kaydedilerek kat ettikleri toplam mesafe ve hız Ethovision XT program ile hesaplanmaktadır. Elde edilen veriler lokomotor aktivite hakkında bilgi vermektedir [11].

Zorunlu Yüzme Testi

1977 yılında ilk kez porsolt tarafından tanımlanan bu test, deneklerin zemine temas etmelerini önleyecek miktarda su ile dolu silindir içerisinde sadece kafalarının suyun dışında batmadan kaldığı ve sudan kurtulma çabasından vazgeçip (öğrenilmiş çaresizlik) pasif geçirdikleri sürelerin (hareketsiz geçirdikleri süreler) karşılaştırılması esasına dayanmaktadır [12].

İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler, SPSS 21 programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilmesi durumunda, post hoc Tukey testi ile farklılıkların hangi gruplar arasında olduğu belirlendi. AKG düzeyi ve ağırlık değişimi 1., 2., 3. ve 4. ölçüm olarak ifade edilen herbir veriyi bir önceki veri ile kıyaslamamızı sağlayan eşleştirilmiş t testi (paired t test) kullanılarak analiz edildi. P değerinin 0.05'ten küçük olması durumunda farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçlar, ortalama \pm standart hata (SEM) olarak ifade edildi.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Diyabet oluşturulan grupların ağırlıkları, 4 hafta yüksek kalorili diyet ile beslenme sonrası anlamlı olarak artarken ($p<0.05$) (2. ölçüm), STZ uygulanmasından sonra anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0.05$) (3. ölçüm). DM+FLU grubunda yapılan son ağırlık ölçümü anlamlı biçimde artarken ($p<0.05$), DM grubunda anlamlı olarak azalmıştır (4. ölçüm) ($p<0.05$, Tablo 2).

Tablo 2. Deneklerin Ağırlık Değişimi.

GRUPLAR	1.ÖLÇÜM	2.ÖLÇÜM	3. ÖLÇÜM	4. ÖLÇÜM
KONTROL	28,06 \pm 0,47	27,15 \pm 1,34	26,79 \pm 1,34	25,56 \pm 0,90
DM	28,06 \pm 1,67	31,04 \pm 1,67*	23,27 \pm 1,71*	21,09 \pm 1,28*
DM+MİN	26,61 \pm 0,76	29,97 \pm 1,09*	25,56 \pm 0,74*	25,27 \pm 0,71
DM+FLU	28,5 \pm 1,45	31,48 \pm 1,83*	22,5 \pm 1,05*	26,13 \pm 1,08*
DM+MET	29,00 \pm 1,12	31,36 \pm 1,11*	24,66 \pm 1,69*	24,34 \pm 1,10
DM+MET+MİN	28,35 \pm 0,41	31,87 \pm 0,85*	25,98 \pm 0,93*	25,73 \pm 0,86
MİN	25,78 \pm 0,65	25,52 \pm 0,86	24,97 \pm 0,78	25,22 \pm 0,58
MET	31,53 \pm 0,57	31,07 \pm 0,68	29,97 \pm 1,01	27,59 \pm 0,97*

Hesaplamalarda eşleştirilmiş t testi (paired t test) kullanıldı (* $p<0.05$).

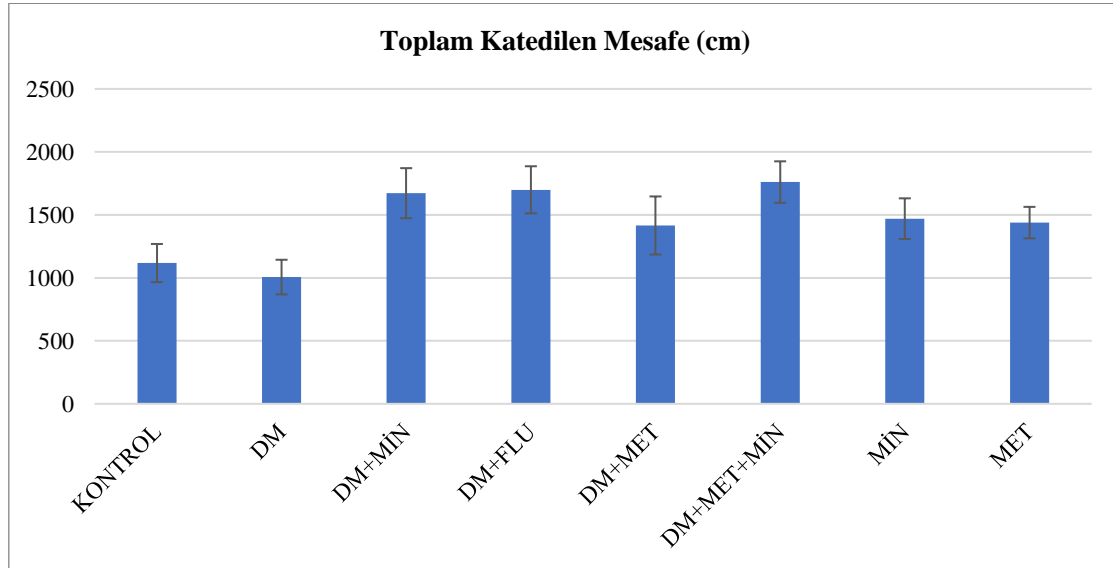
Deneklerin AKG düzeyleri her hafta ölçülmüştür. Diyabet oluşturulan grupların AKG düzeyleri STZ uygulanmasından bir hafta sonra anlamlı biçimde artmıştır (3. ölçüm) ($p<0.05$, Tablo 3). Yapılan son ölçümde (4. ölçüm) DM, DM+MİN gruplarında AKG anlamlı biçimde artarken, DM+MET grubunda AKG anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.05$, Tablo 3).

Tablo 3: Deneklerin AKG Düzeyi Değişimi.

GRUPLAR	1.ÖLÇÜM	2.ÖLÇÜM	3.ÖLÇÜM	4.ÖLÇÜM
KONTROL	97,25±3,89	88,25±8,13	97,25±2,74	93,88±3,55
DM	114,86±2,25	101±6,73	269,43±9,75*	322,29±15,73*
DM+MİN	106,86±9,04	105±6,14	266,85±4,70*	309,14±12,35*
DM+FLU	114,17±5,35	108,5±9,23	311±16,91*	336±30,48
DM+MET	116,80±4,03	108,6±7,78	262,4±4,61*	219,4±4,56*
DM+MET+MİN	121,71±6,58	103,85±9,41	332,29±21,8*	306,29±30,13
MİN	97,44±7,17	91,44±3,64	91,78±4,57	101,78±3,96
MET	98,75±3,99	90,13±4,88	89,63±2,69	92,75±4,18

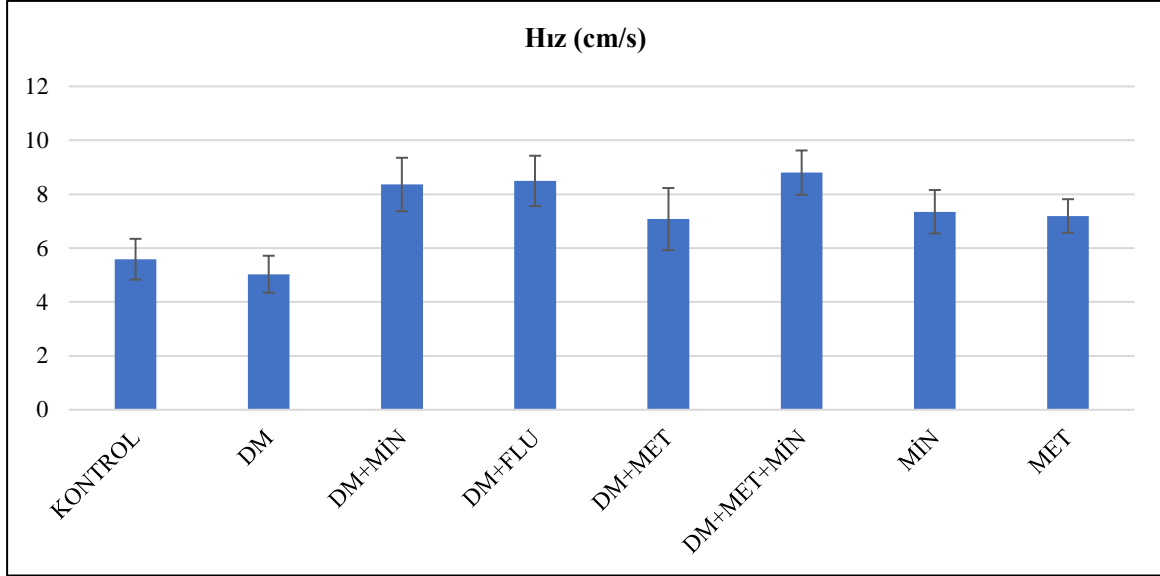
Hesaplamalarda eşleştirilmiş t testi (paired t test) kullanıldı (* $p<0.05$).

Açık alan testinden elde edilen verilere göre gruplar arasında toplam katedilen mesafe ve hız bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Diyabet ile lokomotor aktivitede bir değişiklik olmadığı, uygulanan ilaçlarında lokomotor aktivitede anlamlı bir değişiklik meydana getirmediği gösterilmiştir (Şekil 1, Şekil 2) ($p>0.05$).



Şekil 1. Açık Alan Testi, Toplam Katedilen Mesafe Bulguları.

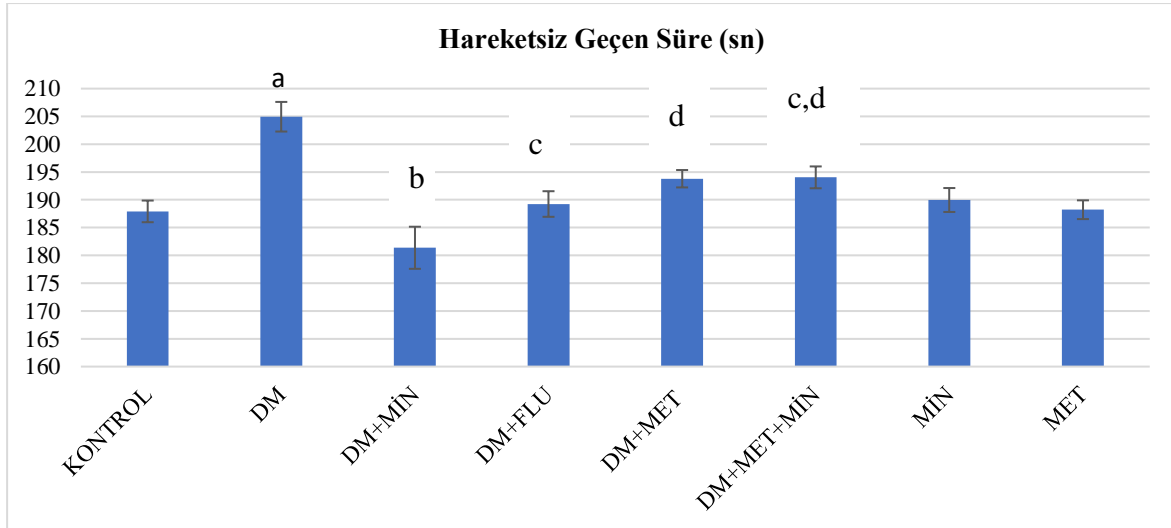
Her sütun 6-8 farenin, ortalama \pm SEM değerlerini belirtmektedir. Hesaplamalarda tek-yönlü varyans analizi (ANOVA); takiben post hoc Tukey testi kullanıldı.



Şekil 2. Açık Alan Testi, Hız Bulguları.

Her sütun 6-8 farenin, ortalama \pm SEM değerlerini belirtmektedir. Hesaplamalarda tek-yönlü varyans analizi (ANOVA); takiben post hoc Tukey testi kullanıldı.

Zorunlu yüzme testine göre, KONTROL grubu ile karşılaştırıldığında DM grubunda hareketsiz geçen sürenin anlamlı olarak arttığı ($p < 0.05$), DM+MİN, DM+FLU ve DM+MET+MİN gruplarında ise hareketsiz geçen sürenin DM grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir ($p < 0.05$, Şekil 3).



Şekil 3. Zorunlu Yüzme Testi, Hareketsiz Geçen Süre Bulguları.

Her sütun 6-8 farenin, ortalama \pm SEM değerlerini belirtmektedir. ^a $p < 0.001$ KONTROL grubu ile karşılaştırıldığında, ^b $p < 0.001$ DM grubu ile karşılaştırıldığında, ^c $p < 0.05$ DM grubu ile karşılaştırıldığında, ^d $p < 0.05$ DM+ MİN grubu ile karşılaştırıldığında. Hesaplamalarda tek-yönlü varyans analizi (ANOVA); takiben post hoc Tukey testi kullanıldı.

Diyabetli grupların tümünde HbA1c değeri KONTROL grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$, Tablo 4).

Tablo 4. Grupların HbA1c Değerleri (mmol/L)

GRUPLAR	HbA1c değeri (mmol/L)
KONTROL	5,43±0,14
DM	11,96±0,04 ^a
DM+MİN	11,58±0,32 ^a
DM+FLU	10,74±0,23 ^a
DM+MET	10,70±0,24 ^a
DM+MET+MİN	11,30±0,39 ^a
MİN	5,13±0,08
MET	5,43±0,05

^a $p<0,05$ KONTROL grubu ile karşılaştırıldığında. Hesaplamalarda tek-yönlü varyans analizi (ANOVA); takiben post hoc Tukey testi kullanıldı.

Diyabetin kronik hiperglisemi ile karakterize metabolik bir bozukluk olduğu, diyabete sekonder gelişen komplikasyonların diyabetin prognozunu kötüleştirdiği bilinmekte, diyabet ile depresyon arasında çift yönlü bir ilişki olduğu ileri sürülmektedir [13]. Ayrıca çalışmamızın konusunu oluşturan insülin direnci ile seyreden tip 2 diyabetin tüm diyabetlilerin %90-95'ini etkilediği ve yapılan bir çalışmada tip 2 diyabetlilerde diyabet olmayanlara göre depresyon görülme insidansının %24 arttığı belirtilmiştir [14].

Diyabet oluşturulan gruplarda yüksek kalorili beslenme sonrası anlamlı bir ağırlık artışı, STZ uygulamasından sonra ise anlamlı bir kilo kaybı görülmüştür. Bunun yanı sıra STZ uygulamasından sonra AKG düzeylerinde görülen artış ile HbA1c değerindeki artış diyabetik tablo ile bütünleşmektedir.

Açık alan testinden elde edilen toplam katedilen mesafe ve hız verisine göre gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Yapılan bir çalışmada diyabetin lokomotor aktiviteyi baskıladığı[15], bir diğerinde ise etkilemediği belirtilmiştir [16].

Bu çalışmada, daha önce yapılan çalışmalarla benzer biçimde DM grubunun zorunlu yüzme testinde geçirdiği hareketsiz sürenin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir [15, 17, 18].

Çalışmada kullandığımız yüksek kalorili diyet ve STZ ile oluşturulan deneysel tip 2 diyabet modeli araştırmalarda sıklıkla kullanılan ve kabul gören bir yöntemdir [19-21]. Diyabet durumunda ağırlık artışının azalması, AKG düzeyinin ve HbA1c değerinin artışı, lokomotor aktivitede değişiklik gözlenmeksizin depresyon benzeri davranış görülmesi deneysel diyabet modelinin ve diyabet ile ilişkili depresyonun başarılı bir şekilde oluşturulduğunu göstermektedir.

Diyabet ve depresyon patofizyolojisinde inflamatuvar yolağın rol oynadığının rapor edilmesinin üzerine bu hastalıkların tedavisinde santral sinir sistemi üzerinde etkili olduğu bilinen, ikinci kuşak tetrasiklin grubu bir antibiyotik olan minosiklin denenmeye başlanmıştır. Çalışmamızda minosiklinin diyabetle ilişkili depresyon benzeri davranış üzerine etkileri incelendi.

Çalışmada fluoksetin haricindeki ilaçların ağırlık değişimi üzerine etkisinin bulunmadığı, metformin haricindeki ilaçların da AKG üzerine etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Ancak, yakın zamanda yapılan bir çalışmada, minosiklinin gümüş nanopartikülünün AKG' yi düşürdüğü bildirilmiştir[22].

Çalışmada, açık alan testinden elde edilen verilere göre, lokomotor aktivitenin belirlenmesi için ölçülen katedilen toplam mesafe ve hızları değişmeksizin zorunlu yüzme testinden elde edilen verilere göre STZ uygulanan diyabetik grupta hareketsiz sürenin arttığı, fluoksetin, minosiklin ve metformin uygulamalarıyla bu artışın geri çevrilebildiği gözlemlenmiştir. Bu da adı geçen ilaç uygulamaları ile antidepresan-benzeri etki oluştuğunu gösterir. DM+MET+MİN grubunda hareketsiz geçirilen zamanın DM+MİN grubundan fazla olmasının sebebi çalışmamızda metforminin lokomotor aktiviteyi az da olsa baskılamasına bağlanabilir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler ile; diyabetin sebep olduğu depresyon üzerine subkronik minosiklin ve minosiklin-metformin kombinasyonunun en az fluoksetin kadar etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Minosiklinin deneysel iskemik felç sonrası meydana gelen depresyon ve anksiyete üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, minosiklinin (30mg/kg, i.p., 14 gün) lokomotor aktiviteyi değiştirmeksizin antidepresan-benzeri etkiler gösterdiği bildirilmiştir [23]. STZ ile diyabet oluşturulan farelere kronik olarak uygulanan (4 hafta) minosiklinin (100mg/kg, p.o) zorunlu yüzme testinde geçirilen hareketsiz zamanı azalttığı, bu etkinin proinflamatuvar sitokin düzeyi ve mikroglyal aktivasyonun azalması yolu ile ortaya çıktığı bildirilmiştir[18].Başka bir çalışmada da benzer biçimde STZ uygulanarak diyabet oluşturulan ratlarda kronik minosiklin (80mg/kg, p.o., 3 hafta) tedavisi ile zorunlu yüzme testinde geçirdikleri hareketsiz zamanın azaldığı gösterilmiştir [24].

Minosiklinin; gerek diyabet durumunda uyarılan gerekse son zamanlarda depresyon gelişimine zemin hazırladığı işaret edilen inflamatuvar yolak üzerine etki göstererek her iki hastalığın tedavisi için iyi bir alternatif olabileceği öngörülmektedir.

Çalışmamızda diyabetin sebep olduğu depresyon tedavisi için minosiklinin ve minosiklin-metformin kombinasyonunun uygulaması ile fluoksetine eşdeğer antidepresan etkiler gözlenmiştir. Antidepresan etkinin mevcut tedavide yaklaşık 3 haftalık süre sonunda gözlenmeye başladığı, klasik antidepresan tedaviler ile etki başlangıcı gecikmekte ve bu süreçte görülen yan etkilerden dolayı hastanın tedaviye uyuncunun büyük oranda yitirildiği bilinmektedir. Bu sebeptendir ki antidepresan etkinin mümkün olan en kısa sürede başlaması oldukça önem arz etmektedir.

Minosiklinin hızlı başlayan antidepresan etkisi ve metforminin diyabete bağlı bozulan metabolizmayı düzenlemesi iki ilacın beraber kullanımının diyabet tedavisinde yeni bir alternatif

olabileceğini düşündürmektedir. Bu anlamda daha evvel yapılan çalışma olmaması, çalışmamızda da bu kombinasyonun AKG düzeyini istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaltması ve antidepresan benzeri etkiler göstermesi gelecekte yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır.

Sonuç olarak, minosiklin ve minosiklin-metformin kombinasyonu antidepresan etkiler göstermiştir. Bu etkiden daha ziyade minosiklinin sorumlu olduğu metforminin antidepresan etkiyi arttırmadığı söylenebilir. İleride yapılacak çalışmalar ile bu etkiden sorumlu mekanizmalar aydınlatılıp depresyon patojenezinde inflamatuvar yolların rolü anlaşılabilir ve bu yolak üzerine etkili alternatif antidepresan tedaviler geliştirilebilir.

Sınırlılıklar

Çalışmada DM+MET+FLU grubunun olması DM+MET+MIN grubu ile elde edilen verileri daha iyi analiz etmemizi sağlayabilirdi.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri komisyonu tarafından TIP.21.012' nolu araştırma proje numarası ile desteklenmiştir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: *M.İ.Ç.*; Tasarım: *M.İ.Ç.*; Denetim: *M.İ.Ç., M.E.*; Kaynaklar: *M.İ.Ç.*; Malzemeler: *M.İ.Ç., M.E.*; Veri Toplama ve/veya işleme: *M.İ.Ç., E.U.*; Analiz ve/veya yorumlama: *M.İ.Ç., M.E., E.U., İ.K.*; Literatür taraması: *M.İ.Ç.*; Makalenin yazılması: *M.İ.Ç., M.E., E.U., İ.K.*; Kritik inceleme: *M.İ.Ç., M.E., E.U., İ.K.*; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

ETİK KURUL ONAYI

Çalışmamız T.C. Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi Hayvan deneyleri Yerel Etik Kurulu (DÜHADEK) tarafından 2019/09 protokol numarasıyla 12.11.2019 tarihinde onay almıştır.

KAYNAKLAR

1. Alam, U., Asghar, O., Azmi, S., Malik, R. A. (2014). General aspects of diabetes mellitus. *Handbook of Clinical Neurology*, 126, 211-222. [\[CrossRef\]](#)
2. Vancampfort, D., Correll, C. U., Gallinger, B., Probst, M., De Hert, M., Ward, P. B., Rosenbaum, S., Gaughran, F., Lally, J., Stubbs, B. (2016). Diabetes mellitus in people with schizophrenia, bipolar disorder and major depressive disorder: a systematic review and large scale meta-analysis. *World Psychiatry*, 15(2), 166-174. [\[CrossRef\]](#)
3. Buchberger, B., Huppertz, H., Krabbe, L., Lux, B., Mattivi, J. T., Siafarikas, A. (2016). Symptoms of depression and anxiety in youth with type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, 70, 70-84. [\[CrossRef\]](#)
4. Holt, R. I., de Groot, M., Golden, S. H. (2014). Diabetes and depression. *Current Diabetes Reports*, 14(6), 491. [\[CrossRef\]](#)
5. Rosenblat, J. D., McIntyre, R. S. (2018). Efficacy and tolerability of minocycline for depression: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Journal of Affective Disorders*, 227, 219-225. [\[CrossRef\]](#)
6. Tumminia, A., Vinciguerra, F., Parisi, M., Frittitta, L. (2018). Type 2 diabetes mellitus and alzheimer's disease: role of insulin signalling and therapeutic implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3306. [\[CrossRef\]](#)
7. Chen, Y., Hu, W., Li, Q., Zhao, S., Zhao, D., Zhang, S., Wei, Z., Yang, X., Chen, Y., Li, X., Liao, C., Han, J., Miao, Q. R., Duan, Y. (2021). NGBR is required to ameliorate type 2 diabetes in mice by enhancing insulin sensitivity. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100624. [\[CrossRef\]](#)
8. Naderi, Y., Sabetkasaei, M., Parvardeh, S., Zanjani, T. M. (2017). Neuroprotective effect of minocycline on cognitive impairments induced by transient cerebral ischemia/reperfusion through its anti-inflammatory and anti-oxidant properties in male rat. *Brain Research Bulletin*, 131, 207-213. [\[CrossRef\]](#)
9. Chen, J. L., Luo, C., Pu, D., Zhang, G. Q., Zhao, Y. X., Sun, Y., Zhao, K. X., Liao, Z. Y., Lv, A. K., Zhu, S. Y., Zhou, J., Xiao, Q. (2019). Metformin attenuates diabetes-induced tau hyperphosphorylation in vitro and in vivo by enhancing autophagic clearance. *Experimental Neurology*, 311, 44-56. [\[CrossRef\]](#)
10. Kudryashov, N. V., Kalinina, T. S., Shimshirt, A. A., Korolev, A. O., Volkova, A. V., Voronina, T. A. (2018). Antidepressant-like effect of fluoxetine may depend on translocator protein activity and pretest session duration in forced swimming test in mice. *Behavioural Pharmacology*, 29(4), 375-378. [\[CrossRef\]](#)
11. Seibenhener, M. L., Wooten, M. C. (2015). Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of Visualized Experiments* 96, 52434. [\[CrossRef\]](#)
12. Porsolt, R. D., Le Pichon, M., Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604), 730-732. [\[CrossRef\]](#)

13. Alzoubi, A., Abunaser, R., Khassawneh, A., Alfaqih, M., Khasawneh, A., Abdo, N. (2018). The bidirectional relationship between diabetes and depression: a literature review. *Korean Journal of Family Medicine*, 39(3), 137-146. [\[CrossRef\]](#)
14. Nouwen, A., Winkley, K., Twisk, J., Lloyd, C. E., Peyrot, M., Ismail, K., Pouwer, F. (2010). Type 2 diabetes mellitus as a risk factor for the onset of depression: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia*, 53(12), 2480-2486. [\[CrossRef\]](#)
15. Zhou, X., Gan, T., Fang, G., Wang, S., Mao, Y., Ying, C. (2018). Zeaxanthin improved diabetes-induced anxiety and depression through inhibiting inflammation in hippocampus. *Metabolic Brain Disease*, 33(3), 705-711. [\[CrossRef\]](#)
16. da Silva Dias, I. C., Carabelli, B., Ishii, D. K., de Moraes, H., de Carvalho, M. C., Rizzo de Souza, L. E., Zanata, S. M., Brandão, M.L., Cunha, T.M., Ferraz, A.C., Cunha, J.M., Zanoveli, J. M. (2016). Indoleamine-2,3-dioxygenase/kynurenine pathway as a potential pharmacological target to treat depression associated with diabetes. *Molecular Neurobiology*, 53(10), 6997-7009. [\[CrossRef\]](#)
17. Zhu, X., Zhang, Y. M., Zhang, M. Y., Chen, Y. J., Liu, Y. W. (2021). Hesperetin ameliorates diabetes-associated anxiety and depression-like behaviors in rats via activating Nrf2/ARE pathway. *Metabolic Brain Disease*, 36(7), 1969-1983. [\[CrossRef\]](#)
18. Sakurai, M., Iwasa, R., Sakai, Y., Morimoto, M. (2021). Minocycline prevents depression-like behavior in streptozotocin-induced diabetic mice. *Neuropathology*, 41(2), 109-117. [\[CrossRef\]](#)
19. Zhang, C., Deng, J., Liu, D., Tuo, X., Xiao, L., Lai, B., Yao, Q., Liu, J., Yang, H., Wang, N. (2018). Nuciferine ameliorates hepatic steatosis in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic mice through a PPAR α /PPAR γ coactivator-1 α pathway. *British Journal of Pharmacology*, 175(22), 4218-4228. [\[CrossRef\]](#)
20. Path, G., Mehana, A. E., Pilz, I. H., Alt, M., Baumann, J., Sommerer, I., Hoffmeister, A., Seufert, J. (2020). NUPRI preserves insulin secretion of pancreatic beta-cells during inflammatory stress by multiple low-dose streptozotocin and high-fat diet. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 319(2), 338-344. [\[CrossRef\]](#)
21. Cheng, Y., Yu, X., Zhang, J., Chang, Y., Xue, M., Li, X., Lu, Y., Li, T., Meng, Z., Su, L., Sun, B., Chen, L. (2019). Pancreatic kallikrein protects against diabetic retinopathy in KK Cg-A^y/J and high-fat diet/streptozotocin-induced mouse models of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 62(6), 1074-1086. [\[CrossRef\]](#)
22. Kazmi, S. A. R., Qureshi, M. Z., Sadia, Alhewairini, S. S., Ali, S., Khurshid, S., Saeed, M., Mumtaz, S., Mughal, T. A. (2021). Minocycline-derived silver nanoparticles for assessment of their antidiabetic potential against alloxan-induced diabetic mice. *Pharmaceutics*, 13(10). [\[CrossRef\]](#)
23. Camargos, Q. M., Silva, B. C., Silva, D. G., Toscano, E. C. B., Oliveira, B. D. S., Bellozi, P. M. Q., Jardim, B. L. D. O., Vieira, É. L. M., Oliveira, A. C. P. D., Sousa, L.P., Teixeira, A. L., Miranda, A. S. D., Rachid, M. A. (2020). Minocycline treatment prevents depression and anxiety-like behaviors and promotes neuroprotection after experimental ischemic stroke. *Brain Research Bulletin*, 155, 1-10. [\[CrossRef\]](#)
24. Amorim, D., Puga, S., Bragança, R., Braga, A., Pertovaara, A., Almeida, A., Pinto-Ribeiro, F. (2017). Minocycline reduces mechanical allodynia and depressive-like behaviour in type-1 diabetes mellitus in the rat. *Behavioural Brain Research*, 327, 1-10. [\[CrossRef\]](#)



GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY (GC-MS) ANALYSIS OF *CONSOLIDA THIRKEANA* EXTRACT

CONSOLIDA THIRKEANA EKSTRESİNİN GAZ KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE SPEKTROMETRESİ (GC-MS) ANALİZİ

Kenan Can TOK^{1*} , Şeyda YAYLA² 

¹Ankara University, Institute of Forensic Sciences, Department of Forensic Toxicology, Ankara,
Turkey

²Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany, Ankara, Turkey

ABSTRACT

Objective: *Consolida thirkeana* (Boiss.) Bornm. (Ranunculaceae) is considered endemic to Turkey and identified by pale lilac flowers, sessile follicles, and laciniae linear leaves. The genus *Consolida* can often be confused morphologically with *Delphinium*, in this respect, members of the genus *Consolida* need chemotaxonomic interest. In this study, the phytochemical content of *C. thirkeana* was clarified by GC/MS analysis.

Material and Method: The plant material was collected from Ayaş (Ankara/Turkey). A voucher specimen was deposited in the Ankara University Faculty of Pharmacy Herbarium. The aerial part of the plant was powdered in a grinder. The powdered plant parts were macerated with methanol. The GC-MS analysis of extracts was performed using an Agilent 6890 gas chromatograph equipped with an Agilent 5973N quadrupole mass spectrometer (Agilent, USA). Mass Hunter software (Qualitative Analysis B.07.00) and the NIST Mass Spectral Library (2014) were used for determining and identifying compounds.

Result and Discussion: The analysis results of this study showed the presence of 15 compounds in *C. thirkeana* methanol extract. The extract contains 0.65% Glycoside, 0.68% Fatty acid, 0.91% Acylglycerol, 2.41% Carboxylic acid, 38.5% Sugar, 56.86% Sugar alcohol.

Keywords: *Consolida thirkeana*, endemic, GC/MS, herba, phytochemistry

ÖZ

Amaç: *Consolida thirkeana* (Boiss.) Bornm. (Ranunculaceae) Türkiye için endemik olarak kabul edilir ve soluk leylak çiçekleri, sapsız foliküller ve linear lasiniat yaprakları ile tanımlanır. *Consolida* cinsi genellikle morfolojik olarak *Delphinium* ile karıştırılabilir, bu bakımdan *Consolida* cinsinin üyelerinin kemotaksonomik

* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Kenan Can Tok
e-mail / e-posta: kctok@ankara.edu.tr, Phone / Tel.: +90 537 063 0808

olarak araştırılmasına ihtiyaç duyulur. Bu çalışmada, *C. thirkeana*'nın fitokimyasal içeriği GC/MS analizi ile aydınlatılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bitki materyali Ayaş'tan (Ankara/Türkiye) toplanmıştır. Bir herbaryum örneği Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'na kaydedilmiştir. Bitkinin herbası bir öğütücüde toz haline getirildi. Toz haline getirilmiş bitki parçaları metanol kullanılarak maserasyon yöntemi ile ekstre edildi. Ekstrelerin GC-MS analizi, bir Agilent 5973N dört kutuplu kütle spektrometresi (Agilent, ABD) ile donatılmış bir Agilent 6890 gaz kromatografi kullanılarak yapıldı. Bileşiklerin belirlenmesi ve tanımlanması için Mass Hunter yazılımı (Qualitative Analysis B.07.00) ve NIST Mass Spectral Library (2014) kullanıldı.

Sonuç ve Tartışma: Bu çalışmanın analiz sonuçları, *C. thirkeana* metanol ekstresinde 15 bileşiğin varlığını göstermiştir. Ekstre %0.65 Glikozit, %0.68 Yağ asidi, %0.91 Açılgliserol, %2.41 Karboksilik asit, %38.5 Şeker, %56.86 Şeker alkolü içerir.

Anahtar Kelimeler: *Consolida thirkeana*, endemik, fitokimya, GC/MS, herba

INTRODUCTION

The Ranunculaceae family includes usually perennials herbs, the flowers of the family are bisexual and produce achenes, follicles, or baccate fruits [1-5]. The family members, which spread to all continents except Antarctica, are concentrated in the temperate and cold regions of the northern hemisphere [2,6]. Although many members of the family are poisonous, there are also various members that are used medicinally [2,7,8]. The most common chemicals in the Ranunculaceae family are alkaloids, other than that the family includes fatty acids, phytosterols, flavonoids, phenolic acids, and essential oils, in addition, different family members show antitumor, antimicrobial, insecticidal, antiparasitic, antioxidant and antiviral activities [7,9,10].

The genus *Consolida* Gray is called "mahmuzotu" in Turkey [11] and Anatolia is accepted as the center of diversity of the genus [3]. *Consolida thirkeana* (Boiss.) Bornm. is considered endemic to Turkey and is known as "Boz mahmuz" [11]. The plant is identified by pale lilac flowers, sessile follicles, and laciniae linear leaves [3,4]. The genus *Consolida* can often be confused morphologically with *Delphinium* [5,10], in this respect, members of the genus *Consolida* need chemotaxonomic interest. In this study, the phytochemical content of *C. thirkeana* was clarified by GC/MS analysis.

MATERIAL AND METHOD

Plant materials

The plant material was collected from Ayaş (Ankara/Turkey). A voucher specimen was deposited in the Ankara University Faculty of Pharmacy Herbarium in Turkey.

Extraction process

The collected plant materials were dried in the shade. The aerial part of the plant was powdered in a grinder. The powdered plant parts were macerated with methanol for 8 hours x 3 days. After the

extraction process, the fractions were combined and the extract was dried under reduced pressure at 40°C [12].

GC/MS analysis

For the analysis of the extracts, two-step derivatization was performed before the analysis. For derivatization, methoxymation combined with silylation was applied before analysis. We used methoxymation to prevent multiple chromatographic peaks of sugars on the chromatogram [12,13]. Before the methoxymation, we prepared the methoxyamine hydrochloride (MOX) (Sigma-Aldrich, Germany) solution daily in pyridine (25 mg/ml). After the 100 µl sample was evaporated under a gentle nitrogen flow, 50 µl MOX solution was added to the dried sample and waited for 90 minutes at 30°C degrees. Afterward, 50 µl of BSTFA + 1% TMCS (Sigma-Aldrich, Germany) was added, and it was kept for another 45 minutes at 70°C for silylation.

Agilent 6890/5973N model GC/MS (Santa Clara, USA) was used for the analysis. Restek RTX-5MS (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm) gas chromatography capillary column was used as an analytical column (Bellefonte, USA). Gas chromatography grade (99.999%) helium at a 1.5 ml/min flow rate was used as the carrier gas. One µl of the derivatized sample solution was injected in the splitless mode. The injection port and transfer line (AUX) temperatures were set at 280°C. Ion source and quadrupole temperatures were maintained at 230°C, and 150°C, respectively. The GC oven temperature started at 50°C and was held for 2 min, then increased to 280°C at 3°C/min and held for 12 min. The total analysis time was 90 min. The mass spectrum was obtained by electron ionization at 70 eV. 50-500 atomic mass units were scanned by the detector. Mass Hunter software (Qualitative Analysis B.07.00) and the NIST Mass Spectral Library (2014) are used for determining and identifying compounds.

RESULT AND DISCUSSION

Figure 1 shows the major compounds identified in *C. thirkeana* extract by GC-MS. The analysis shows the presence of 15 compounds (Table 1) in methanol extract. Methanol extract of *C. thirkeana* contains 0.65% Glycoside, 0.68% Fatty acid, 0.91% Acylglycerol, 2.41% Carboxylic acid, 38.5% Sugar, 56.86% Sugar alcohol.

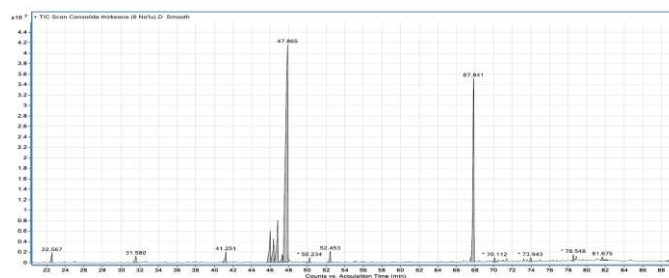


Figure 1. Compounds identified by GC-MS in *C. thirkeana* extract.

Table 2. Compounds identified by GC-MS in *C. thirkeana* extract.

#	RT (min)	Identified Compounds	Area Sum %	Classification
1	22.567	Glycerol	1.09	Sugar alcohol
2	31.58	Malic acid	0.94	Carboxylic acid
3	41.251	Aconitic acid	1.47	Carboxylic acid
4	46.005	D-fructose	4.38	Sugar
5	46.368	D-(-)-fructose	3.22	Sugar
6	46.811	D-Glucose	5.81	Sugar
7	47.312	D-Allose	1.1	Sugar
8	47.865	D-Glucitol (Sorbitol)	54.57	Sugar alcohol
9	50.234	Palmitic acid	0.68	Fatty acid
10	52.453	Myo-Inositol	1.2	Sugar alcohol
11	67.841	Sucrose	22.79	Sugar
12	70.112	Maltose	0.58	Sugar
13	73.943	D-Lactose	0.62	Sugar
14	78.548	β -D-Galactopyranaside	0.65	Glycoside
15	81.675	Glycerol monostearate	0.91	Acylglycerol

The analysis results of this study showed that sugar alcohols were the highest content in the extract at 56.86%. The sugar alcohols in the extract were determined as D-Glucitol (Sorbitol) 54.57%, Myo-Inositol 1.2%, and Glycerol 1.09%. D-Glucitol (Sorbitol) (54.57%) constitutes the highest content of the extract. Sorbitol, a sugar alcohol with a sweet taste, is used as a sugar substitute and metabolized slowly in the human body [14]. Sugar alcohols can be one of the ingredients of pharmaceutical products such as throat lozenges [15] and they do not cause dental caries and also are important for diabetics because of their low calorie and glycemic index [16]. Moreover, sugar alcohols act on intestinal health with their prebiotic properties [17].

The literature search showed that this phytochemical study on *C. thirkeana*, a medicinally important plant belonging to the Ranunculaceae family, is the first report except for some studies [4,18]. For genera, such as *Delphinium* and *Consolida*, that are close in morphological characteristics, the use of different classification tools such as chemical characters is required for an exact diagnosis. This study may provide chemotaxonomic benefits for *C. thirkeana*.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. M. Mesud HÜRKÜL for the collection of plant materials.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception: *K.C.T., Ş.Y.*; Design: *K.C.T., Ş.Y.*; Supervision: *K.C.T.*; Resources: *K.C.T., Ş.Y.*; Materials: *K.C.T., Ş.Y.*; Data collection and/or processing: *K.C.T.*; Analysis and/or interpretation: *K.C.T., Ş.Y.*; Literature search: *K.C.T., Ş.Y.*; Writing manuscript: *K.C.T.*; Critical review: *K.C.T., Ş.Y.*; 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. Brummitt, R.K. (1992). Vascular plant families and genera. Richmond, UK: Royal Botanic Gardens, Kew.
2. Heywood, V.H., Brummitt, R.K., Culham, A., Seberg, O. (2007). Flowering plant families of the world. Ontario: Firefly Books.
3. Davis, P.H. (1965). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, (Vol. 1, pp.119-134). Edinburgh, UK: Edinburgh University Press.
4. Hürkul, M.M. (2021). Leaf, stem and root anatomy of *Consolida thirkeana* (Boiss.) Bornm. (Ranunculaceae). *Journal of Research in Pharmacy*, 25(4), 415-419. [CrossRef]
5. Gümüşok, S., Hürkul, M.M. (2021). Anatomy of *Consolida orientalis* (Gay) Schröd. (Ranunculaceae): Root, stem and leaf. *İstanbul Journal of Pharmacy*, 51(3), 3-4. [CrossRef]
6. POWO. (2022). Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. <http://www.plantsoftheworldonline.org> Accessed: 10.04.2022.
7. Evans, W. (2002). Trease and Evans pharmacognosy (15th ed.). WB Saunders.
8. Metcalfe, C.R., Chalk, L. (1965). Anatomy of dicotyledones. (Vol. 2). Oxford, UK: Clarendon Press.
9. Hao, D.C. (2018). Ranunculales medicinal plants: Biodiversity, chemodiversity and pharmacotherapy. London, UK: Academic Press.

10. Yin, T., Cai, L., Ding, Z. (2020). A systematic review on the chemical constituents of the genus *Consolida* (Ranunculaceae) and their biological activities. *RSC Advances*, 10(58), 35072-35089. [\[CrossRef\]](#)
11. 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.
12. Kıymacı, M.E., Tok, K.C., Hürkul, M.M. (2022). A study on phytochemical analysis and antibacterial activity of *Quercus macranthera* subsp. *sypirensis* (K. Koch) Menitsky branch and leaf extracts. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 46(1), 160-169. [\[CrossRef\]](#)
13. Blau, K., Halket, J.M. (1993). Handbook of derivatives for chromatography. Wiley.
14. Awuchi, C.G., Echeta, K.C. (2019). Current developments in sugar alcohols: Chemistry, nutrition, and health concerns of sorbitol, xylitol, glycerol, arabitol, inositol, maltitol, and lactitol. *International Journal of Advanced Academic Research*, 5, 1-33.
15. Saraiva, A., Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F., Raposo, A. (2020). Natural sweeteners: The relevance of food naturalness for consumers, food security aspects, sustainability and health impacts. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), 6285. [\[CrossRef\]](#)
16. Kroger, M., Meister, K., Kava, R. (2006). Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: a review of the safety issues. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(2), 35-47. [\[CrossRef\]](#)
17. Ruiz-Ojeda, F.J., Plaza-Díaz, J., Sáez-Lara, M.J., Gil, A. (2019). Effects of sweeteners on the gut microbiota: a review of experimental studies and clinical trials. *Advances in Nutrition*, 10, 31-48. [\[CrossRef\]](#)
18. Mericli, A.H., Yazici, S., Eroglu-Ozkan, E., Sen, B., Kurtoglu, S., Ozcelik, H., Mericli, F. (2012). Norditerpenoid alkaloids from *Consolida thirkeana* and *Consolida sulphurea*. *Chemistry of Natural Compounds*, 48(3), 525-526.



MOLECULAR IDENTIFICATION AND LIPOLYTIC ACTIVITY OF YARROWIA LIPOLYTICA ISOLATED FROM YOGHURT CREAM

YOĞURT KAYMAĞINDAN İZOLE EDİLEN YARROWIA LIPOLYTICA'NIN MOLEKÜLER
İDENTİFİKASYONU VE LİPOLİTİK AKTİVİTESİ

Merve Eylül KIYMACI^{1*} , Duygu SIMSEK^{2,3} , Nurten ALTANLAR² 

¹University of Health Sciences Turkey, Gülhane Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical
Microbiology, 06018, Ankara, Turkey

²Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, 06560,
Ankara, Turkey

³Turkish Medicines and Medical Devices Agency, 06520, Ankara, Turkey

ABSTRACT

Objective: *Yarrowia lipolytica* is an aerobic dimorphic yeast that produces various metabolites such as enzymes, organic acids, proteins, surfactants and has industrial potential in some biotransformation and bioremediation reactions. To be a preliminary study to industrial productions, in present study it was aimed to isolate *Y. lipolytica* strain from yoghurt cream, perform its molecular characterization and investigate the lipolytic activity.

Material and Method: A total of 10 samples were taken from the homemade yoghurt cream obtained by fermented milk from local dairy producers in Ankara. Yeast-Peptone-Glycerol (YPG) broth and *Yarrowia lipolytica* Distinctive (YLD) agar media were used for isolation of the species. Species-level identification was carried out by ITS-Polymerized chain reaction analysis. Lipolytic activity was determined with Rhodamine-B/Olive Oil Agar nutrient medium procedure.

Result and Discussion: Yeast colonies were isolated from homemade yoghurt creams by growing in YPG broth. Yeasts were stained with Gram staining method and Gram-positive stained ones were inoculated on YLD agar. At the end of the incubation period, the brown pigmented colony growing on YLD agar was selected as *Yarrowia* species. According to the molecular characterization results the brown pigmented colony was identified as *Yarrowia lipolytica* with a total of 358 bases, 100% sequence matching ratio and 100% similarity ratio and the strain was determined as lipase positive. The development of the *Y. lipolytica* strain isolated in our study as a producer culture that can be used in industrial production should be supported by further studies to benefit from its various properties.

Keywords: Industrial yeast, lipolytic activity, *Yarrowia lipolytica*

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Merve Eylül Kıymacı
e-mail / e-posta: mekiymaci@gmail.com, **Phone / Tel.:** +903123046073

ÖZ

Amaç: *Yarrowia lipolytica* enzimler, organik asitler, proteinler, yüzey aktif maddeler gibi çeşitli metabolitler üreten ve bazı biyotransformasyon ve biyoremediasyon reaksiyonlarında endüstriyel potansiyele sahip olan aerobik dimorfik bir mayadır. Endüstriyel üretimlere bir ön çalışma olması amacıyla, bu çalışmada *Y. lipolytica* suşunun yoğurt kremasından izole edilmesi, moleküler karakterizasyonunun yapılması ve lipolitik aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Ankara'daki farklı yerel süt üreticilerinin sütü fermente ederek elde ettikleri ev yapımı yoğurt kaymaklarından toplam 10 örnek alınmıştır. *Yarrowia* türlerinin izolasyonunda Yeast-Peptone-Glycerol (YPG) sıvı besiyeri ve *Yarrowia lipolytica* Distinctive (YLD) agar besiyeri kullanılmıştır. *Y. lipolytica*'nın tür tanımlaması ITS-Polimerize zincir reaksiyonu analizi ile yapılmıştır. Lipolitik aktivite; Rodamin-B/Zeytin yağı agar besiyeri prosedürü ile belirlenmiştir.

Sonuç ve Tartışma: Ev yapımı yoğurt kaymağı örneklerinden YPG besiyerinde gelişen maya kolonileri izole edilmiştir. Maya izolatları Gram boyama yöntemi ile boyanmış ve Gram pozitif boyananlar YLD agar üzerine inoküle edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda YLD agar üzerinde gelişen kahverengi pigmentli koloniler *Yarrowia* türü olarak seçilmiştir. Moleküler karakterizasyon sonuçlarına göre kahverengi pigmentli bir koloni toplam 358 baz, %100 dizi uyum oranı ve %100 benzerlik oranı ile *Yarrowia lipolytica* olarak tanımlanmış ve suşun lipaz pozitif olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda izole edilen *Y. lipolytica* suşunun çeşitli özelliklerinden faydalanmak üzere, endüstriyel üretimlerde kullanılabilecek bir üretici kültür olarak geliştirilmesi, yapılacak ileriki çalışmalarla desteklenmelidir.

Anahtar Kelimeler: : Endüstriyel maya, lipolitik aktivite, *Yarrowia lipolytica*

INTRODUCTION

Yarrowia lipolytica (*Y. lipolytica*) is an aerobic and dimorphic yeast that found in different types of food (cheeses, yoghurt, kefir, olive oil, soya sauce etc.) naturally and formerly known as *Candida lipolytica*. This yeast has a Generally Recognized as Safe (GRAS) status and produces various amounts of metabolites like proteolytic and lipolytic enzymes, organic acids, and proteins [1, 2]. *Y. lipolytica* prefers to live in lipid-rich environments and can use hydrophobic carbon sources by various mechanisms [3, 4]. It is stated in studies that the efficiency in the production of enzymes (alkaline proteases, lipases, and RNase), which are among their metabolites, varies depending on the substrate preferred by the strain [1]. In addition, based on these properties some studies shown that *Y. lipolytica* has industrial importance and used in fatty acid, single cell protein, flavoring (fruity aroma, γ -decalactone), citric acid, steroid biotransformation reactions [5] and also used for bioremediation, and production of biosurfactants [6]. One of the most important features of *Y. lipolytica* is, it has ability to accumulate lipids at levels exceeding 20-50% of the cell dry weight and to assimilate fatty substances, therefore this yeast is also called oleaginous microorganism [7].

The use of oils and lipids as a carbon source by *Y. lipolytica* has attracted the attention of lipase enzymes produced by yeast. Lipases are a kind of serine hydrolases that hydrolyze long-chain fatty acids to fatty acids and glycerol and are also known as triacylglycerol acylhydrolases [8]. Microbial lipases are among the important enzymes that can contribute to industrial production as a biocatalysts or have applications in food, pharmaceutical areas. *Y. lipolytica* is accepted as a good producer microorganism due to the metabolites it secretes, including lipases [9]. Studies have shown that environmental

components and conditions are effective on the lipase production of the microorganism. For example, olive oil is one of the best raw materials to produce lipase; while some substrates are suitable for high production of extracellular lipase such as casein, peptone, tryptone and yeast extract [10, 11], some of them like glucose, glycerol or mineral nitrogen compounds suppress the lipase production [12] and inorganic compounds do not trigger lipase synthesis [10, 11].

Based on such good properties, it is important to isolate new *Yarrowia* species in order to provide resources and find uses for various industries. The present study as a response to this need was aimed to investigate the molecular characterization and lipolytic activity of *Y. lipolytica* from yoghurt cream.

MATERIAL AND METHOD

Isolation of the yeast

A total of 10 samples were taken from the homemade yoghurt cream obtained by fermenting milk from local dairy producers in Ankara region. Samples transferred into sterile 100 ml sample containers under aseptic conditions and transported to the laboratory by cold chain. The contents of each yoghurt sample were mixed homogeneously and then a 2.5 ml sample was transferred aseptically into 25 ml antibiotic added Yeast-Peptone-Glycerol (YPG) broth and incubated for 48 hours at 30 °C with shaking at 150 rpm. The medium content on a liter scale (pH 7.0) is as follows: 20 g peptone, 10 g yeast extract and 20 g glucose, 20 g agar. After the two-day incubation, samples were taken and inoculated on YPG agar media, and incubated for 48 hours at 30 °C. At the end of the incubation, the morphology of each different colonies formed in the solid medium was examined under the microscope by Gram staining. Yeast colonies were selected according to Gram staining results and inoculated on *Yarrowia lipolytica* Distinctive (YLD) Agar medium. Petri plates were incubated for 24 hours at 30 °C and at the end of incubation brown pigmented colonies were stocked with the thought of *Y. lipolytica*. The content of YLD Agar medium in liter scale (pH 7.0) is as follows: 5 g peptone, 5 g yeast extract, 1.8 g L-tyrosine, 0.28 g MnSO₄.7H₂O, 5 g lactate, 20 g agar. In the presence of manganese ions in the medium, it produces brown pigment from tyrosine [13].

Molecular Characterization

Species identification of the selected yeast sample according to these characteristics was carried out in the BM Laboratory by ITS-Polymerized chain reaction (PCR) analysis. DNA isolation from the sample was performed with the EurX GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA isolation kit. The amount and purity of the obtained DNAs were controlled by spectrophotometric measurement in Thermo Scientific Nanodrop 2000 device. As primers, ITS1 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' and ITS4 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3' were used. PCR conditions were 5 minutes initial denaturation at 95

°C, 40 cycles (45 seconds denaturation at 95°C, annealing at 57°C for 45 seconds, elongation at 72°C for 60 seconds), and final elongation at 72°C for 5 minutes. To amplify the targeted region, one-step PCR was performed with the Solis Biodyne FIREPol® DNA Polymerase Taq polymerase enzyme. In the purification stage of the PCR product, the MAGBIO "HighPrep™ PCR Clean-up System" (AC-60005) purification kit was used for the single band samples obtained. Sanger Sequencing was performed in the Macrogen Netherlands laboratory, with the ABI 3730XL Sanger sequencing instrument and the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Reads obtained with the ITS1 – ITS4 primers were contiguous to form a consensus sequence. CAP contig assembly algorithm was used in BioEdit software to perform this process.

Determination of Lipolytic Activity

The determination of the lipolytic activity was carried out on Rhodamine-B/Olive Oil Agar (ROA) nutrient medium. The medium was prepared in two stages, similar to the method of Kumar et al. (2012) [14]. The media containing 8.0 g of Nutrient broth, 4.0 g of NaCl, and 20 g of agar per liter was sterilized in an autoclave and its pH was adjusted to 7.0, cooled to 50°C in a water bath. Ten ml of 1 mg/ml rhodamine-B solution and 31.25 ml olive oil were separately sterilized by filtration and were added to the medium with stirring. The homogenized mixture was poured onto agar plates and allowed to solidify. The yeast suspension, the density of which was adjusted to 0.5 McFarland, was inoculated dropwise into the medium, and incubated at 30°C for 48 hours. Olive oil was expected to hydrolyze into fatty acids because of metabolism and to react with rhodamine-B in the environment.

RESULT AND DISCUSSION

Yeast colonies were isolated from homemade yoghurt cream samples by growing in Yeast-Peptone-Glycerol (YPG) broth. Isolated colonies were stained with Gram procedure and Gram-positive colored colonies were inoculated on *Yarrowia lipolytica* Distinctive (YLD) Agar medium to distinguish *Yarrowia* colonies from other yeasts. After incubation period (24 hours at 30°C), a brown pigmented colony was selected to be *Yarrowia* species and stored until molecular characterization.

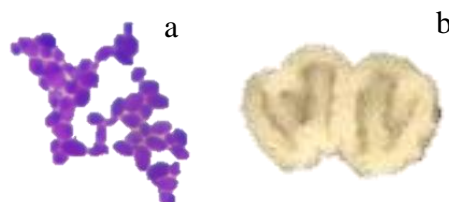


Figure 1. *Yarrowia lipolytica*, (a) Gram morphology under light microscope and (b) colony morphology

According to the molecular analysis results carried out with the ITS1 – ITS4 primers, the sample was identified as *Y. lipolytica* with a total of 358 bases, 100% sequence matching ratio and 100% similarity ratio. Gene sequences presented in Table 1.

Table 1. Gene Sequence of *Yarrowia lipolytica*

Primers	Gene Sequence of <i>Yarrowia lipolytica</i>
ITS1: 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGATTTTATCTATTTCT GTGGATTTCTGGTATATTACAGCGTCATTTTATCTCAATTATAACTATC AACAAACGGATCTCTTGGCTCTCACATCGATGAAGAACGCAGCGAACC GCGATATTTTTTTGTGACTTGCAGATGTGAATCATCAATCTTTGAACGC
ITS4: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'	ACATTGCGCGGTATGGCATTCCGTACCGCACGGATGGAGGAGCGTGT TCCTCTGGGATCGCATTGCTTTCTTGAAATGGATTTTTTAAACTCTCA ATTATTACGTCATTTACCTCCTTCATCCGAGATTACCCGCTGAACTTA AGCATATCAATAAGCGGAGGA

Lipolytic activity of *Y. lipolytica* was determined according to Kumar et al.'s (2012) method [14]. The reaction was evaluated as positive by observing the formation of an orange color fluorescent zone under UV light. Activity result was shown in Figure 2.



Figure 2. Lipolytic activity of *Yarrowia lipolytica* under UV light.

Microbial enzymes have an important place in the industrial market (including application areas such as food, pharmaceutical and other industries). Lipases are also around 5% in this market in addition to some other enzymes (e.g., proteases) [15]. New biotechnological applications involving lipases include biopolymer production, biodiesel synthesis, and the production of various chemicals and pharmaceuticals [16]. Lipases are also necessary for the physiological requirements of the organism, and this lipase need can be obtained from various sources such as plants, animals, and microorganisms like some bacteria and yeasts [17]. In present study the lipase production of *Y. lipolytica* was determined according to the method of Kumar et al. (2012) [14]. Similar to the results of our study, there are various

lipase-producing *Y. lipolytica* strains in the literature. Louhasakul and Cheirsilp (2022) demonstrated the conversion of crude glycerol to lipid and lipase by *Y. lipolytica* in part of their research [18]. Fraga et al. (2021) investigated the effect of industrial wastes on lipase production of *Y. lipolytica* [19]. Theron et al. (2020) showed that *Y. lipolytica* produced high level extracellular lipase [20]. Kuncharoen et al. (2020) isolated two *Y. lipolytica* strain from fermented rice and determined their lipase activity [21]. de Souza et al. (2019) obtained the lipase production of *Y. lipolytica* strain by solid fermentation process [22]. Yan et al. (2018) also determined the lipolytic activity of *Y. lipolytica* [23]. Darvishi et al. (2009) stated that plant oils can be used in the production of lipase at low cost in *Y. lipolytica* [24].

Enzymes of microbial origin draw attention due to their striking features such as stability (especially in organic solvent) and high specificity to substrates [25]. Extracellular lipases that can be produced by some microorganisms are also considered as a source and *Y. lipolytica* is one of these sources. It is thought that *Y. lipolytica*, which was isolated in our study and whose lipolytic activity was determined, will also constitute a basic source for future industrial production studies. The development of the *Y. lipolytica* strain isolated in our study as a producer culture that can be used in industrial production should be supported by further studies to benefit from its various properties.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: *M.E.K., D.S.*; Design: *M.E.K., D.S.*; Control: *M.E.K., D.S., N.A.*; Sources: *M.E.K., D.S., N.A.*; Materials: *M.E.K., D.S.*; Data Collection and/or processing: *M.E.K., D.S.*; Analysis and/or interpretation: *M.E.K., D.S., N.A.*; Literature review: *M.E.K., D.S.*; Manuscript writing: *M.E.K., D.S.*; Critical review: *M.E.K., D.S., N.A.*; Other: *M.E.K., D.S., N.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. Barth, G., Gaillardin, C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, 19(4), 219–237. [\[CrossRef\]](#)

2. Fickers, P., Benetti, P.H., Wache, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M.S., Nicaud, J.M. (2005). Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research*, 5(6-7), 527–543. [\[CrossRef\]](#)
3. Barth, G., Gaillardin, C. (1996). *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 313-388. [\[CrossRef\]](#)
4. Fickers, P., Benetti, P.H., Wache, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M.S. (2005). Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research*, 5, 527-543. [\[CrossRef\]](#)
5. Aloulou, A., Rodriguez, J.A., Puccinelli, D., Mouz, N., Leclaire, J., Leblond, Y., Carrière, F. (2007). Purification and biochemical characterization of the LIP2 lipase from *Yarrowia lipolytica*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771(2), 228–237. [\[CrossRef\]](#)
6. Gonçalves, F.A.G., Colen, G., Takahashi, J.A. (2014). *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry. *The Scientific World Journal*, 476207. [\[CrossRef\]](#)
7. Ratledge, C. (2010). *Single cell oils for the 21st century*. AOCS Press, Champaign, p. 1-20. [\[CrossRef\]](#)
8. Sarda, L., Desnuelle, P. (1958). Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions. *Biochim Biophys Acta*, 30, 513-521. [\[CrossRef\]](#)
9. Treichel, H., Oliveira, D., Mazutti, M.A., Luccio, M.D., Oliveira, J.V. (2010). A Review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technology*, 3, 182-196. [\[CrossRef\]](#)
10. Darvishi, F., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H., Momenbeik F. (2009). Effect of plant oils upon lipase and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast. *BioMed Research International*, article ID 562943. [\[CrossRef\]](#)
11. Fickers, P., Nicaud, J.M., Gaillardin, C., Destain, J., Thonart, P. (2004). Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4), 742-749. [\[CrossRef\]](#)
12. Fickers, P., Marty, A., Nicaud, J.M. (2011). The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization, and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 29(6), 632-644. [\[CrossRef\]](#)
13. Carreira, A., Ferreira, L. M., Loureiro, V. (2001). Brown pigments produced by *Yarrowia lipolytica* result from extracellular accumulation of homogentisic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3463–3468. [\[CrossRef\]](#)
14. Kumar, D., Kumar, L., Nagar, S., Raina, C., Parshad, R., Gupta, V. K. (2012). Screening, isolation, and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. *Archives of Applied Science Research*, 4(4), 1763-1770. [\[CrossRef\]](#)
15. Vakhlu, J., Kour, A. (2006). Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(1), 69-85. [\[CrossRef\]](#)
16. Babu, I.S., Rao, G.H. (2007). Lipase production by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 in solid state fermentation using mixed substrate. *Research Journal of Microbiology*, 2, 469-474. [\[CrossRef\]](#)

17. Jaeger, K.E., Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 390-397. [\[CrossRef\]](#)
18. Louhasakul, Y., Cheirsilp, B. (2022). Potential use of industrial by-products as promising feedstock for microbial lipid and lipase production and direct transesterification of wet yeast into biodiesel by lipase and acid catalysts. *Bioresource Technology*, 348, 126742. [\[CrossRef\]](#)
19. Fraga, J.L., Souza, C.P.L., Pereira, A.D.S., Aguiéiras, E.C.G., de Silva L.O., Torres, A.G., Freire, D.G., Amaral, P.F.F. (2021). Palm oil wastes as feedstock for lipase production by *Yarrowia lipolytica* and biocatalyst application/reuse. *3 Biotech*, 11(4), 191. [\[CrossRef\]](#)
20. Theron, C.W., Vandermies, M., Telek, S., Steels, S., Fickers, P. (2020). Comprehensive comparison of *Yarrowia lipolytica* and *Pichia pastoris* for production of *Candida antarctica* lipase B. *Scientific Reports*, 10(1), 1741. [\[CrossRef\]](#)
21. Kuncharoen, N., Techo, S., Savarajara, A., Tanasupawat, S. (2020). Identification and lipolytic activity of yeasts isolated from foods and wastes. *Mycology*, 11(4), 279-286. [\[CrossRef\]](#)
22. de Souza, C.E.C., Ribeiro, B.D., Coelho, M.A.Z. (2019). Characterization and application of *Yarrowia lipolytica* lipase obtained by solid-state fermentation in the synthesis of different esters used in the food industry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 189(3), 933-959. [\[CrossRef\]](#)
23. Yan, J., Han, B., Gui, X., Wang, G., Xu, L., Yan, Y., Madzak, C., Pan, D., Wang, Y., Zha, G., Jiao, L. (2018). Engineering *Yarrowia lipolytica* to simultaneously produce lipase and single cell protein from agro-industrial wastes for feed. *Scientific Reports*, 8(1), 758. [\[CrossRef\]](#)
24. Darvishi, F., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H., Momenbeik, F. (2009). Effect of plant oils upon lipase and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 562943. [\[CrossRef\]](#)
25. Salihu, A., Alam, M.Z., AbdulKarim, M.I., Salleh, H.M. (2012). Lipase production: an insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservation & Recycling*, 58, 36-44. [\[CrossRef\]](#)



DEVELOPMENT OF NEW CYCLOPHILIN D RECEPTOR INHIBITORS FOR THE TREATMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS

MS HASTALIĞININ TEDAVİSİ İÇİN YENİ SİKLOFİLİN D RESEPTÖR İNİHİTÖRLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Gözde YALCIN OZKAT^{1*} , Birsen HUYLU² 

¹Recep Tayyip Erdogan University, Faculty of Engineering and Architecture, Bioengineering
Department, 53100 Rize, TURKEY

²Recep Tayyip Erdoğan University, Institute of Graduate Studies, Department of Advanced
Technologies, 53100 Rize, TURKEY

ABSTRACT

Objective: *In this study, it was aimed to carry out computational studies for the development of new molecules for the inhibition of the cyclophilin D (CypD) receptor, which causes the disability of mitochondrial function in multiple sclerosis (MS) disease.*

Material and Method: *Pharmacophore modeling study was applied via the PharmaGist Web server to the CypD inhibitors detected by the literature search. According to the best pharmacophore models from PharmaGist, 80 molecules were obtained from the ZINCPharmer database, and in silico ADME/Toxicology analysis was applied to these molecules. Then, molecular docking was performed with the ligands that gave the best results as a result of ADME/Tox analyses with the Autodock Vina program.*

Result and Discussion: *ZINC00390492 molecule shows the best binding affinity and binding profile with both CypD, Sphingosine-1-phosphate receptor 1. It has been demonstrated that this molecule may be a lead molecule for the treatment of MS.*

Keywords: *Cyclophilin D, in silico, molecular docking, multiple sclerosis, pharmacophore modeling*

ÖZ

Amaç: *Bu çalışmada, multipl skleroz (MS) hastalığında mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna neden olan siklofilin D (CypD) reseptörünün inhibisyonu için yeni moleküllerin geliştirilmesine yönelik hesaplamalı çalışmaların yapılması amaçlanmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *Literatür taraması ile tespit edilen CypD inhibitörlerine PharmaGist Web sunucusu üzerinden farmakofor modelleme çalışması uygulanmıştır. PharmaGist'in en iyi farmakofor modellerine göre*

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Gözde Yalcin Ozkat
e-mail / e-posta: gozde.yalcin@erdogan.edu.tr, **Phone / Tel.:** + 90 506 505 50 74

ZINCPharmer veri tabanından 80 molekül elde edilmiş ve bu moleküllere *in silico* ADME/Toksikoloji analizi uygulanmıştır. Daha sonra Autodock Vina programı ile ADME/Tox analizleri sonucunda en iyi sonucu veren ligandlar ile moleküler yerleştirme yapılmıştır.

Sonuç ve Tartışma: ZINC00390492 molekülü hem CypD, hem de Sfingosin-1-fosfat reseptörü 1 ile en iyi bağlanma afinitesi ve bağlanma profilini göstermektedir. Bu molekülün, MS tedavisi için bir öncü molekül olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Farmakofor modelleme, *in silico*, moleküler doking, multipl skleroz, siklofilin D

INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is thought to be one of the main neurological diseases observed in young adults, as well as approximately 3 million people worldwide. In MS, which is a chronic and inflammatory disease that occurs in the central nervous system, the most important difference between a healthy neuron and MS neuron is demyelination. [1]. Clinical symptoms of MS include fatigue, motor dysfunction, nystagmus, loss of coordination or balance, acute paralysis, lethargy, speech and vision disorders, and cognitive impairment [2].

Mitochondrial damage known to be caused by reactive oxygen and nitrogen derivatives is the most common pathology in MS and causes chronic inflammation.[3]. Studies are carried out to elucidate the pathogenesis of MS using experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) animal models that mimic the characteristics of the disease.

Although it is known that demyelination in axons is of great importance in the development of physical disability, the underlying mechanism is not fully known. The relationship between mitochondrial dysfunction and axon demyelination has been examined in the literature, and it has been reported that a series of ionic imbalances lead to energy deficiencies that cause Ca^{2+} overload may be caused [4]. Ca^{2+} accumulation in mitochondria in healthy neurons stimulates oxidative metabolism. Ca^{2+} influx from the mitochondria is mediated by various transporters, and Ca^{2+} influx is directed by the activation of a protein complex called the permeability transition pore (PTP). Overloading of mitochondria with Ca^{2+} causes inappropriate activation of PTP, resulting in impaired mitochondrial functions and cell death.

The main marker of mitochondrial damage is mitochondrial permeability transition (mPT). The permeability of the mitochondrial inner membrane increases and begins to pass all molecules less than 1500 Da non-selectively. cyclophilin D (CypD), which has a great effect on permeability by interacting with the mitochondrial inner membrane, is a peptidyl-prolyl isomerase found in the mitochondrial matrix [5]. CypD, which has an important role in the regulation of mitochondrial PTP, binds to PTP and facilitates permeability [6, 7]. Therefore, inhibition of CypD prevents mitochondrial and synaptic damage caused by $A\beta$ and oxidative stress and restores mitochondrial and cognitive functions.

Cyclophilins; It is a family of proteins found in mammals, plants, bacteria, and many other living

organisms. Cyclophilins are known to be involved in various processes such as protein folding [8], receptor signaling, and cellular response [9]. In addition, cyclophilins have become therapeutic targets because of their critical roles in inflammation [10], viral infections [11], vascular dysfunction [12], wound healing [13], and cancer progression [14].

There are 19 different isoforms of cyclophilin that are highly similar [15]. Among human cyclophilins, 5 isoforms are known [16, 17, 18]. One of these isoforms, CypD, is found in the mitochondrial matrix. CypD is involved in the modulation of mitochondrial permeability transition pores (mPTP) and affects mitochondrial function. CypD is thought to control PTP opening by sensitizing mPTP to calcium, inorganic phosphate, and reactive oxygen species. Opening of mPTP causes a rapid influx of cytosolic contents into the mitochondrial matrix thereby impairing mitochondrial respiration. CypD deficiency inhibits mPTP opening induced by excess Ca^{2+} and thus protects cells from oxidative stress-induced cell death in various disease models [19]. Blocking CypD did not alter responses to other PTP stimuli such as adenine nucleotides, membrane depolarization, ubiquinones, pH [20, 21].

One study developed experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice with MS lacking CypD; these mice appeared to recover partially, in contrast to the mice with CypD. Examining the spinal cords of both groups of mice revealed that the axons of the mice lacking CypD were preserved, despite a similar degree of inflammation. In addition, neurons of mice lacking CypD were found to be resistant to reactive oxygen and reactive nitrogen species. In addition, CypD-deficient brain mitochondria was found to sequester high Ca^{2+} levels [22]. Another study showed that the absence of CypD does not affect energy conservation and ATP synthesis [23].

CypD, a molecular target in mPTP, can be inhibited by cyclosporine A (CsA). However, toxicity due to long-term use of CsA prevented its use as MS treatment [24]. When molecules for inhibition of mPTP are screened in the literature, the molecule with the highest specificity is CypD (PPIase) inhibitor CsA. However, CsA lacks clinical significance due to its immunosuppressive effect by inhibiting calcinuria and its inability to cross the blood-brain barrier [16]. Antamanide (AA) and Sanglifehrin A (SfA) are produced for inhibition of mPTP, but they are insufficient to be drug molecules due to serious side effects such as nephrotoxicity, hepatotoxicity, neurotoxicity [25, 26]. Other molecules with known CypD inhibitory properties have low solubility and high toxicity, as well as low blood-brain barrier and cell permeability. Considering all these reasons, CypD is an important target for drug development studies for the treatment of MS disease.

Sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1P1) is a G protein-coupled receptor. It is active in an important mechanism that leads to the emergence and progression of MS symptoms. This makes S1P1 an important target for drug development studies. Although there are preclinical and clinical studies on S1P1, no modulators with high selectivity have been found in the literature. Within the scope of the

study, which is the subject of this article, it was aimed to develop a multi-target drug by examining the effectiveness of molecules with cyclophilin D inhibitory properties on S1P1 using computational studies.

MATERIAL AND METHOD

Pharmacophore Modelling

Various molecules that inhibit cyclophilin D were determined by searching the literature. The molecules were loaded into the PharmaGist [27] Web tool, and pharmacophore analysis was performed. Conformational analysis was not implemented during the pharmacophore analysis process. The hypotheses generated by PharmaGist were uploaded to the ZINCPharmer [28] web tool to find new molecules with similar properties.

In Silico ADME/Toxicology Analysis

Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion (ADME), and toxicology assessment were performed using SwissADME [29] for a total of 80 ligand molecules. In ADME-Toxicology evaluation, ligands were determined by Lipinski's rules, molecular weight, logP values, H-bond acceptor, donor numbers, CYP2D6 inhibition, and blood-brain barrier properties were investigated. It was determined that 3 of the ligand molecules that conflicted with Hypothesis 2 and 7 of the molecules that conflicted with Hypothesis 4 met the appropriate ADME-Toxicology conditions out of a total of 80 ligands.

Preparation of Receptor and Ligands

The 3D structure (PDB ID: 2Z6W) of the CypD protein in complex with CsA was selected from the RCSB PDB Protein database [30]. The 3D receptor protein was isolated from *Homo sapiens* and *Tolypocladium inflatum*, expressed in the *Escherichia coli* BL21(DE3) expression system. The crystal structure of the protein was determined using the X-Ray Diffraction Crystallography method and has a resolution of 0.96 Å. The protein downloaded from the Protein Data Bank is in dimer form. Using the Discovery Studio Visualizer 2020 [31] program, the antagonist (CsA) in 3D structure was separated, water and other residual molecules were deleted, the antagonist was also recorded. Polar hydrogens and Gasteiger charges were added to the protein structure using the AutoDock Tools [32] package, the receptor protein was prepared in PDBQT format for AutoDock Vina.

The molecules were downloaded in sdf format via the link in the ZincPharmer database. Then H atoms were added to select 10 ligand molecules with the appropriate conditions using the Discovery Studio Visualizer 2020 program, and the ligands were corrected with the "clean geometry" option. Then ligands were edited with AutoDock Tools in PDBQT format and recorded.

Molecular Docking

Molecular docking studies were performed with ligands in Table 1 using the AutoDock Vina [33] program. A grid box was created with AutoDock Tools for the docking area. The x, y, z values of the grid box are 30, 46, 56 respectively; The x, y, z centers of the grid box were set to -13,812, -5.25, -30,799, respectively. Docking of 10 ligands with CyPD receptor protein was performed. The result files obtained as a result of molecular docking of 10 different ligand molecules with the receptor protein were analyzed in AutoDock Tools. In addition, molecular docking of these 10 ligands was performed with the sphingosine 1-phosphate receptor (PDB ID:3V2Y).

Table 1. Features of selected compounds for molecular docking

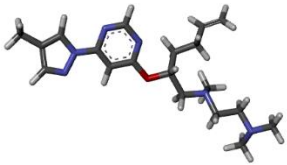
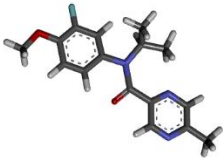
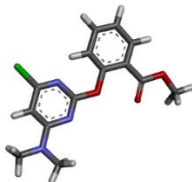
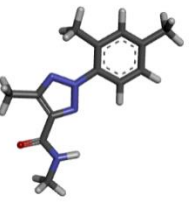
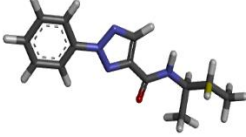
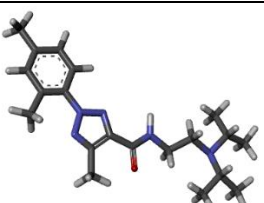
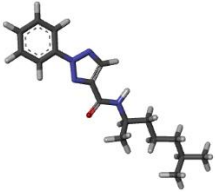
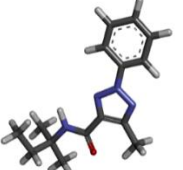
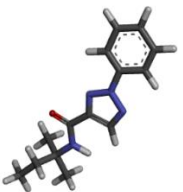
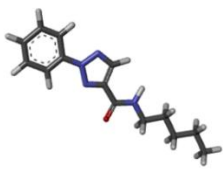
Compound	IUPAC Name	3D Structure
ZINC72474618	<i>N,N,N</i> -trimethyl- <i>N'</i> -[2-[6-(4-methylpyrazol-1-yl)pyrimidin-4-yl]oxyhex-5-enyl]ethane-1,2-diamine	
ZINC60353659	<i>N</i> -(3-fluoro-4-methoxyphenyl)-5-methyl- <i>N</i> -propan-2-ylpyrazine-2-carboxamide	
ZINC01496377	Methyl 2-[4-chloro-6-(dimethylamino)pyrimidin-2-yl]oxybenzoate	
ZINC09603787	2-(2,4-dimethylphenyl)- <i>N</i> ,5-dimethyltriazole-4-carboxamide	
ZINC32674515	<i>N</i> -butan-2-yl-2-phenyltriazole-4-carboxamide	
ZINC09950012	2-(2,4-dimethylphenyl)- <i>N</i> -[2-[di(propan-2-yl)amino]ethyl]-5-methyltriazole-4-carboxamide	

Table 1 (continued). Features of selected compounds for molecular docking

Compound	IUPAC Name	3D Structure
ZINC23228074	<i>N</i> -(6-methylheptan-2-yl)-2-phenyltriazole-4-carboxamide	
ZINC36719024	5-methyl- <i>N</i> -(2-methylbutan-2-yl)-2-phenyltriazole-4-carboxamide	
ZINC44514282	<i>N</i> -(2-methylbutan-2-yl)-2-phenyltriazole-4-carboxamide	
ZINC17322385	<i>N</i> -pentyl-2-phenyltriazole-4-carboxamide	

RESULT AND DISCUSSION

Pharmacophore Modelling

Based on the number of high scores and high feature matching (hydrophobicity, aromaticity, hydrogen bond acceptor, hydrogen bond donor, negative ionization) by pharmacophore analysis, 4 different hypotheses were selected (Table 2).

Table 2. Hypotheses and properties obtained as a result of pharmacophore modeling

Hypo	Score	Mols	Features	Aromatic	Hydrophobic	H-Donors	H-Acceptors	Negatives	Positives
1	33.07	3	7	2	0	1	4	0	0
2	31.18	14	4	2	0	0	2	0	0
3	31.75	4	6	2	0	1	3	0	0
4	31.75	4	6	2	0	1	3	0	0

The hypotheses and their features are given in Figure 1. In the figure, the hydrogen bond acceptor feature is shown in pink, the negative ionization feature is shown in gray, and the feature of having a ringed aromatic structure is shown in blue.

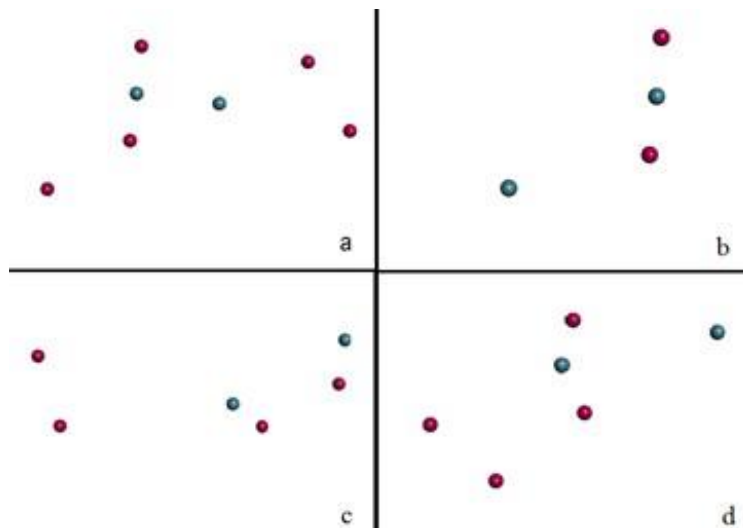


Figure 1. Features of Hypothesis 1 (a), Hypothesis 2 (b), Hypothesis 3 (c), and Hypothesis 4 (d)

The hypothesis were uploaded to the ZINCPharmer web tool to find new molecules with similar properties. Molecules were selected considering low RMSD value, low molecular weight, and a high number of rotatable bonds (Rbnds). 20 molecules for each of the 4 hypothesis were selected and recorded (Table 3).

***In Silico* ADME/Toxicology Analysis**

ZINC72474618, ZINC60353659, and ZINC01496377 molecules that conflict with Hypothesis 2 and ZINC09603787, ZINC32674515, ZINC09950012, ZINC23228074, ZINC36719024, ZINC44514282, and ZINC17322385 molecules that conflict with Hypothesis 4 was determined to meet the ADME-toxicity requirements.

For a molecule to provide drug properties, it must obey the Lipinski rules. According to Lipinski rules; the molecular weight should be less than 500 Da, the mLogP value should be less than 4.15, the number of hydrogen bond acceptors should be less than 10 and the number of hydrogen bond donors should be less than 5. It was determined that ZINC72474618, ZINC60353659, ZINC01496377, ZINC09603787, ZINC32674515, ZINC09950012, ZINC23228074, ZINC36719024, ZINC44514282 and ZINC17322385 molecules obey Lipinski conditions. TPSA value of less than 30 is a desirable feature. TPSA values of these molecules; 59.31 for ZINC72474618, 55.32 for ZINC60353659, 64.55 for ZINC01496377, 59.81 for ZINC09603787, ZINC32674515, ZINC23228074, ZINC36719024, ZINC4451422382, and ZINC445173223, 63.05 for ZINC09950012 (Table 4).

Table 3. Selected 20 molecules for each of the 4 hypothesis

Pharmacophore	RMSD	Molecular Weight	Rbnds	ZINC No	RMSD	Molecular Weight	Rbnds	ZINC No
Hypothesis 1	0.309	411	6	05260168	0.132	369	8	06818708
	0.137	381	8	06733121	0.124	383	9	06818722
	0.146	341	6	06733126	0.139	409	7	09027329
	0.137	397	10	06733127	0.147	327	5	09066439
	0.138	355	7	06733131	0.136	431	8	09599121
	0.136	369	8	06733132	0.136	446	9	09599123
	0.148	381	5	09166421	0.147	343	6	13552014
	0.128	417	7	06733134	0.145	448	7	17046011
	0.137	424	7	06733137	0.146	357	6	20151896
	0.138	341	6	06818697	0.131	356	5	01228678
Hypothesis 2	0.024	383	7	05333824	0.071	354	10	16000765
	0.073	389	8	07979410	0.361	308	8	01496377
	0.038	361	10	32675907	0.162	344	8	02488877
	0.460	359	15	72474618	0.118	391	7	04979909
	0.059	303	9	60353659	0.402	354	9	13207213
	0.059	311	9	58180599	0.385	377	7	31766509
	0.037	385	11	48401200	0.400	323	9	37868558
	0.055	350	9	34865485	0.038	335	8	15778627
	0.030	415	8	32682599	0.075	375	7	15317824
	0.049	337	10	30007860	0.038	317	7	08339390
Hypothesis 3	0.500	323	6	02157976	0.447	314	6	72229631
	0.279	480	9	02701874	0.336	388	7	08670100
	0.428	351	7	04906283	0.336	414	10	27756652
	0.428	409	11	04906311	0.332	297	6	32541243
	0.336	413	10	08584529	0.428	405	6	04906324
	0.382	346	5	69776578	0.279	442	11	34932032
	0.450	325	5	78619622	0.382	404	8	71281426
	0.279	474	9	15229604	0.382	374	6	71283848
	0.455	364	5	00801224	0.445	314	6	72229628
	0.336	370	7	27756603	0.382	374	6	71287695
Hypothesis 4	0.378	235	7	01686721	0.239	346	12	31820955
	0.248	319	10	04721581	0.415	371	13	32931677
	0.419	244	5	09603787	0.284	316	10	40162051
	0.278	244	5	32674515	0.417	272	7	36719024
	0.234	247	7	12406819	0.280	258	6	44514282
	0.418	359	13	09950012	0.221	402	8	45946126
	0.383	274	7	20729515	0.278	258	6	17322385
	0.239	318	10	20736887	0.241	319	10	20737156
	0.239	272	6	20745632	0.280	357	10	65010034
	0.279	300	9	23228074	0.285	394	11	71812077

Table 4. Hypotheses and properties obtained as a result of pharmacophore modeling

Compound (ZINC code)	Lipinski	TPSA	Consensus Log (Po/w)	Bioavailability Score	GI absorption	BBB permeant	P-gp substrate	CYP2D6 inhibitor	Log Kp (cm/s)
72474618	Yes	59.31	2.54	0.55	High	Yes	No	No	-6.51
60353659	Yes	55.32	2.60	0.55	High	Yes	No	No	-6.45
01496377	Yes	64.55	2.63	0.55	High	Yes	No	No	-5.81
09603787	Yes	59.81	2.08	0.55	High	Yes	No	No	-5.92
32674515	Yes	59.81	2.14	0.55	High	Yes	No	No	-5.77
09950012	Yes	63.05	3.42	0.55	High	Yes	No	No	-5.44
23228074	Yes	59.81	3.29	0.55	High	Yes	No	No	-4.92
36719024	Yes	59.81	2.74	0.55	High	Yes	No	No	-5.53
44514282	Yes	59.81	2.38	0.55	High	Yes	No	No	-5.73
17322385	Yes	59.81	2.53	0.55	High	Yes	No	No	-5.53

All of these 10 ligand molecules can cross the blood-brain barrier. The consensus LogPo/w value represents lipophilic behavior, and the value is expected to be less than 5. Consensus LogPo/w value 2.54 for ZINC2474618, 2.60 for ZINC60353659, 2.63 for ZINC01496377, 2.08 for ZINC09603787, 2.14 for ZINC32674515, 3.42 for ZINC09950012, 3.29 for ZINC23228074, 2.74 for ZINC36719024, 2.38 for ZINC44514282, 2.53 for ZINC17322385 (Table 4). The bioavailability score must be higher than 0.1, all ten molecules have a bioavailability score of 0.55. Gastrointestinal absorption (GI) of all molecules is high. The P-glycoprotein substrate (P-gp) property indicates that the molecule can attach to proteins, and this leads to reduced absorption in the gastrointestinal tract; none of the ligands has P-gp property. Cytochrome P (CYP) enzymes affect liver functions, they should not be inhibited. ZINC72474618 and ZINC09603787 molecules inhibit one CYP enzyme, ZINC60353659, ZINC32674515, ZINC09950012, ZINC44514282 molecules inhibit two each, ZINC01496377, ZINC23228074, ZINC367190285, ZINC1732 molecules each. None of the molecules inhibits the CYP2D6 enzyme.

Molecular Docking

RMSD values and binding affinities obtained as a result of molecular docking with CyPD of ligands meeting ADME/toxicity conditions were examined. The initial binding mode of the CyPD receptor protein with its original ligand, CsA, was calculated as -7.1 kcal/mol. Initial binding modes of ligands; -6.9 for ZINC72474618, -7.6 for ZINC60353659, -7.2 for ZINC01496377, -7.6 for ZINC09603787, -7.0 for ZINC32674515, -7.4 for ZINC09950012, -8.0 for ZINC23228074, -7.0 for ZINC36719024, -7.2 for ZINC44514282, -7.4 kcal/mol for ZINC17322385 (Table 5). It is seen that the binding affinities of these ligands ZINC60353659, ZINC01496377, ZINC09603787, ZINC09950012, ZINC23228074, ZINC44514282, and ZINC17322385 molecules are better than the original antagonist, and the binding affinity of the ZINC23228074 molecule is the best score with -8.0 kcal/mol.

Considering the RMSD values of these ligands in the best 3 binding modes; ZINC09603787, ZINC36719024, ZINC23228074, and ZINC44514282 molecules seem to have RMSD values less than 2 in the majority. When the RMSD values and binding affinities obtained as a result of molecular docking of the S1P1 receptor protein with these 10 ligands are examined; The affinities of ZINC32674515, ZINC23228074, ZINC36719024, and ZINC44514282 molecules in the initial binding modes were calculated as -7.8 kcal/mol, the best score among 10 ligands. Looking at the RMSD values; ZINC32674515, ZINC23228074, ZINC44514282, and ZINC17322385 molecules seem to have RMSD values less than 2 in the majority. Considering these results, it can be said that the best affinity score and RMSD values were obtained as a result of molecular docking of ZINC23228074 and ZINC44514282 ligand molecules with both CyPD and S1P1 receptor proteins.

Molecular docking of CyPD receptor protein was performed with 4 ligands, which were molecularly docked with S1P1 receptor protein in our previous study [34]. When the binding affinities and RMSD values obtained as a result of this are examined; The affinity value of the ZINC00390492 molecule in the first binding mode was calculated as -8.0 kcal/mol, and low RMSD values were obtained as desired. As a result of molecular docking of ZINC00390492 with S1P1, the initial binding mode was calculated as -8.6 kcal/mol and appropriate RMSD values were obtained. Considering these results, it can be said that the ZINC00390492 molecule is an antagonist compatible with both S1P1 and CyPD receptor proteins.

Table 5. Hypothesis and properties obtained as a result of pharmacophore modeling

Compound	S1P1		CyPD	
	Mode	Affinity (kcal/mol)	Mode	Affinity (kcal/mol)
ZINC72474618	1	-6.9	1	-6.9
ZINC60353659	1	-7.3	1	-7.6
ZINC01496377	1	-7.5	1	-7.2
ZINC09603787	1	-7.2	1	-7.6
ZINC32674515	1	-7.8	1	-7.0
ZINC09950012	1	-7.3	1	-7.4
ZINC23228074	1	-7.8	1	-8.0
ZINC36719024	1	-7.8	1	-7.0
ZINC44514282	1	-7.8	1	-7.2
ZINC17322385	1	-7.7	1	-7.4
Inhibitor (CsA)			1	-7.1
ZINC00390492	1	-8.6	1	-8.0
ZINC67740009	1	-7.6	1	-7.7
ZINC19847253	1	-6.3	1	-7.0
ZINC19847241	1	-6.8	1	-6.9
Inhibitor (ML5)	1	-8.4		

When the interactions of ZINC32674515 with the receptor were examined in AutoDock Tools,

the ligand appears to interact with Gly75, Arg82, Asn102, Thr107, Gly109, and Gln111 amino acid residues in Van der Waals. When the interactions of the ZINC32674515 molecule with the receptor are examined in Discovery Studio Visualizer; It is seen that the ligand has alkyl interaction with Met51 and Ala101, *pi-alkyl* interaction with Trp121 and Lys125, *pi-cation* interaction with Arg55, conventional hydrogen bond interaction with His126, and *pi-pi stacked* interaction with Phe113 (Figure 2a).

When the interactions of ZINC23228074 with the receptor are examined in AutoDock Tools, the ligand appears to hydrogen bond with Asn102 and Van der Waals interaction with amino acid residues Arg55, Phe60, Met61, Gly74, Gly75, Gln83, Ala101, Ala103, Phe113, Leu122, and His126. When the interactions of the ZINC23228074 molecule with the receptor are examined in the Discovery Studio Visualizer program, the ligand has *pi-donor* hydrogen bond interaction with Gln111, conventional hydrogen bond interaction with Asn102, *pi-alkyl* interaction with Ala101, alkyl interaction with Ala101, Phe113, and His126 (Figure 2b).

When the interactions of ZINC36719024 with the receptor were examined in AutoDock Tools, the ligand appears to interact with Gly75, Lys76, Ser81, Arg82, Gly109, and Gln111 amino acid residues in Van der Waals. When the interactions of the ZINC36719024 molecule with the receptor are examined in Discovery Studio Visualizer; It is seen that *pi-sulfur* interaction with Met61, conventional hydrogen bond interaction with Gln63, *pi-alkyl* interaction with Ala101, *pi-pi cluster* interaction with Phe113, and unfavorable donor-donor interaction with Arg55 (Figure 2c).

When the interactions of ZINC44514282 with the receptor were examined in Autodock Tools, the ligand generates hydrogen bonds with Thr73 and Van der Waals interaction with amino acid residues Asn69, Gly75, Lys76, Ala101, and Gln111. When the interactions of the ZINC44514282 molecule with the receptor are examined in the Discovery Studio Visualizer program, Met61, Ala101, and Trp121 residues interact with *pi-alkyl*, Arg55 with *pi-cation* interaction, and His126 interact with conventional hydrogen bonds (Figure 2d).

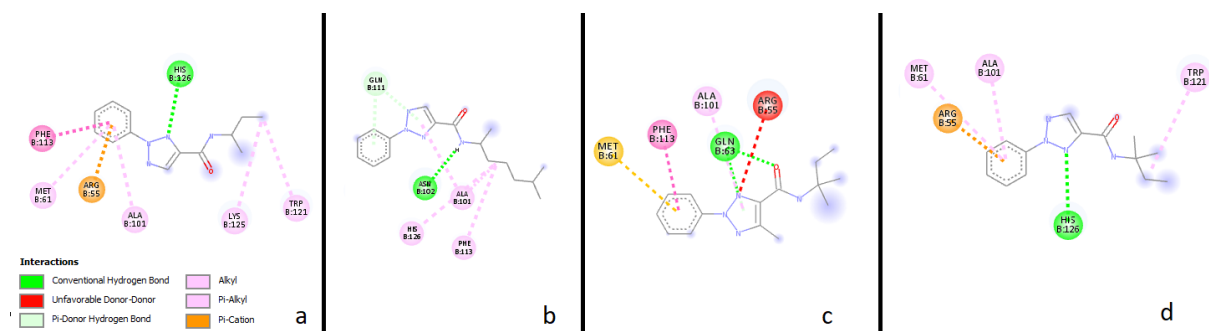


Figure 2. Binding profiles of the ligands with best binding affinity values (a) ZINC32674515, (b) ZINC23228074, (c) ZINC36719024, and (d) ZINC44514282

When the interactions of ZINC00390492 with CypD were examined in AutoDock Tools, the

ligand makes hydrogen bonds with Gly109 and Ser110 amino acid residues, and Van der Waals interaction with Gly74, Gly75, Arg82, Gly109, Ser110, and Gln111 amino acid residues. When the interactions of ZINC00390492 molecule with CypD are examined in Discovery Studio Visualizer; It is observed that Pro105 and Lys125 interact with *pi-alkyl*, with Asn102 and Lys125 halogen interaction, His126 with *pi-sigma* interaction and *pi-pi T-shaped* interaction, with Lys125 *pi-cation* interaction, and with Arg55 conventional hydrogen bond interaction (Figure 3).

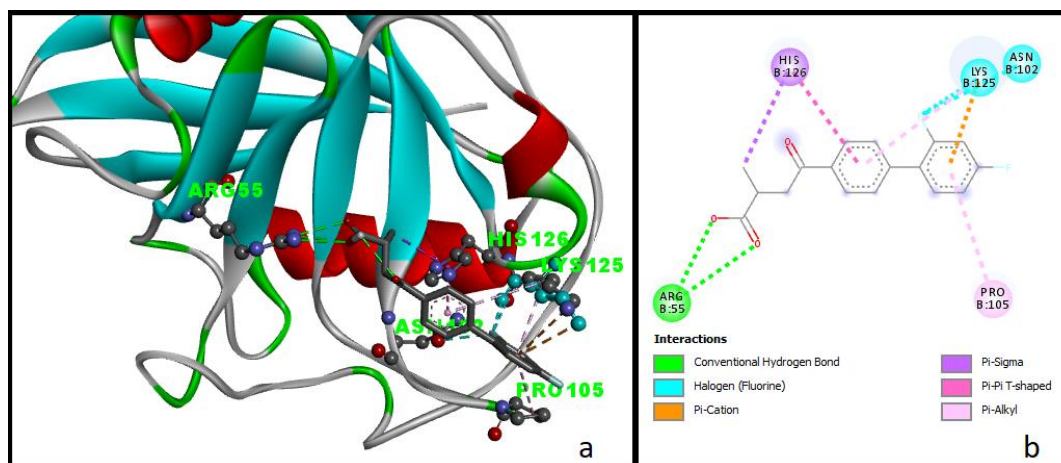


Figure 3. Binding profiles of the ZINC00390492 a) 3D structure view b)2D structure view

The superposition of ZINC00390492 with hypothesis 2 is given in Figure 4. Accordingly, it is seen that the molecule overlaps with the 1 ring aromatic feature, as well as the 2 hydrogen bond acceptor feature (green squares).

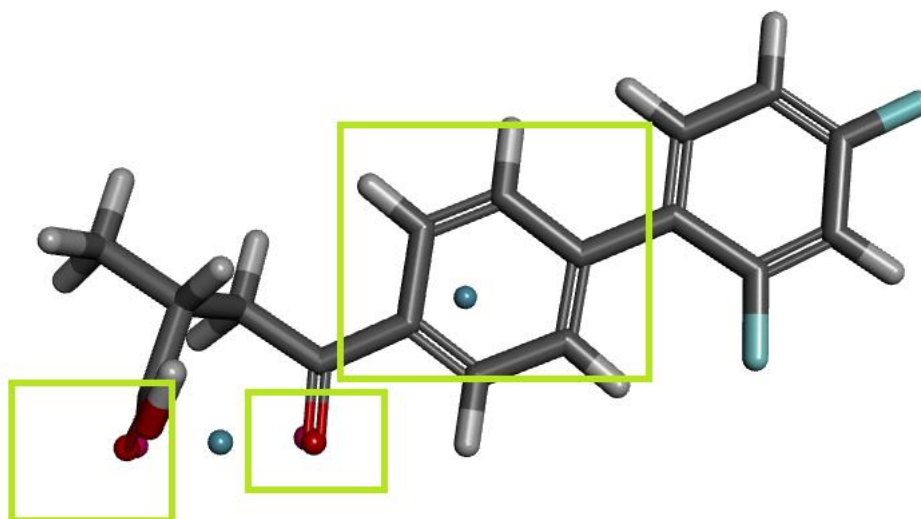


Figure 4. Superposition of ZINC00390492 and hypothesis 2. Features can be seen inside the light green squares.

In conclusion, the ZINC00390492 molecule shows the best binding affinity and binding profile with both CypD, S1P1. It has been demonstrated that this molecule may be a lead molecule for the treatment of MS disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

The calculations reported in this paper were partially performed at TUBITAK ULAKBIM, High Performance and Grid Computing Center (TRUBA resources).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: *G.Y.O.*; Design: *G.Y.O.*; Control: *G.Y.O.*; Sources: *G.Y.O.*, *B.H.*; Materials: *G.Y.O.*, *B.H.*; Data Collection and/or processing: *B.H.*; Analysis and/or interpretation: *G.Y.O.*, *B.H.*; Literature review: *B.H.*; Manuscript writing: *G.Y.O.*, *B.H.*; Critical review: *G.Y.O.*; Other: *G.Y.O.*

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no apparent financial or personal conflict of interest affecting the work of this article.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

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

REFERENCES

1. Frohman, E.M., Racke, M.K., Raine, C.S. (2006). Multiple Sclerosis — The Plaque and Its Pathogenesis. *New England Journal of Medicine*, 354(9), 942–955. [\[CrossRef\]](#)
2. Ortiz, G.G., Pacheco-Moisés, F.P., Bitzer-Quintero, O.K., Ramírez-Anguiano, A.C., Flores-Alvarado, L.J., Ramírez-Ramírez, V., Torres-Sánchez, E.D. (2013). Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: Clinical and basic approach. *Journal of Immunology Research*, 2013, 708659 [\[CrossRef\]](#)
3. Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. [\[CrossRef\]](#)
4. Smith, K.J., Lassmann, H. (2002). The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurology*, 1(4), 232–241. [\[CrossRef\]](#)
5. Tanveer, A., Virji, S., Andreeva, L., Totty, N.F., Hsuan, J.J., Ward, J.M., Crompton, M. (1996).

- Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca²⁺ and oxidant stress. *European Journal of Biochemistry*, 238(1), 166–172. [\[CrossRef\]](#)
6. Alavian, K.N., Beutner, G., Lazrove, E., Sacchetti, S., Park, H.A., Licznerski, P., Li, H., Nabili, P., Hockensmith, K., Graham, M., Porter, G.A., Jonas, E.A. (2014). An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1F₀ ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(29), 10580–10585. [\[CrossRef\]](#)
 7. Basso, E., Fante, L., Fowlkes, J., Petronilli, V., Forte, M. A., Bernardi, P. (2005). Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of cyclophilin D. *Journal of Biological Chemistry*, 280(19), 18558–18561. [\[CrossRef\]](#)
 8. Ivery, M.T.G. (2000). Immunophilins: Switched on protein binding domains? In *Medicinal Research Reviews*, 20(6), 452–484. [\[CrossRef\]](#)
 9. Nath, P.R., Dong, G., Braiman, A., Isakov, N. (2014). Immunophilins Control T Lymphocyte Adhesion and Migration by Regulating CrkII Binding to C3G. *The Journal of Immunology*, 193(8), 3966–3977. [\[CrossRef\]](#)
 10. Yurchenko, V., Constant, S., Eisenmesser, E., Bukrinsky, M. (2010). Cyclophilin-CD147 interactions: A new target for anti-inflammatory therapeutics. *Clinical and Experimental Immunology*, 160(3), 305–317. [\[CrossRef\]](#)
 11. Lin, K., Gallay, P. (2013). Curing a viral infection by targeting the host: The example of cyclophilin inhibitors. *Antiviral Research*, 99(1), 68–77. [\[CrossRef\]](#)
 12. Damsker, J.M., Bukrinsky, M.I., Constant, S.L. (2007). Preferential chemotaxis of activated human CD4 + T cells by extracellular cyclophilin A. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(3), 613–618. [\[CrossRef\]](#)
 13. Kong, W., Li, S., Longaker, M.T., Lorenz, H.P. (2007). Cyclophilin C-associated protein is up-regulated during wound healing. *Journal of Cellular Physiology*, 210(1), 153–160. [\[CrossRef\]](#)
 14. Lee, J., Kim, S.S. (2010). An overview of cyclophilins in human cancers. *Journal of International Medical Research*, 38(5), 1561–1574. [\[CrossRef\]](#)
 15. Galat, A. (2004). Function-dependent clustering of orthologues and paralogues of cyclophilins. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 56(4), 808–820. [\[CrossRef\]](#)
 16. Galat, A., Metcalfe, S.M. (1995). Peptidylproline cis/trans isomerases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 63(1), 67–118. [\[CrossRef\]](#)
 17. Roydon Price, E., Zydowsky, L.D., Jin, M., Hunter Baker, C., Mckeon, F.D., Walsh, C.T. (1991). Human cyclophilin B: A second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(5), 1903–1907. [\[CrossRef\]](#)
 18. Spik, G., Haendler, B., Delmas, O., Mariller, C., Chamoux, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J., Stedman, K., Kocher, H. P., Keller, R., Hiestand, P. C., Movva, N. R. (1991). A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP). *Journal of Biological Chemistry*, 266(17), 10735–10738. [\[CrossRef\]](#)

19. Park, I., Londhe, A.M., Lim, J.W., Park, B.G., Jung, S.Y., Lee, J.Y., Lim, S.M., No, K.T., Lee, J., Pae, A.N. (2017). Discovery of non-peptidic small molecule inhibitors of cyclophilin D as neuroprotective agents in A β -induced mitochondrial dysfunction. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 31(10), 929–941. [\[CrossRef\]](#)
20. Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska, H., Hambleton, M.A., Brunskill, E.W., Sayen, M.R., Gottlieb, R.A., Dorn II, G.W., Molkentin, J.R. (2004). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*, 430(7003), 984–984. [\[CrossRef\]](#)
21. Basso, E., Petronilli, V., Forte, M.A., Bernardi, P. (2008). Phosphate is essential for inhibition of the mitochondrial permeability transition pore by cyclosporin A and by cyclophilin D ablation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(39), 26307–26311. [\[CrossRef\]](#)
22. Forte, M., Gold, B.G., Marracci, G., Chaudhary, P., Basso, E., Johnsen, D., Yu, X., Fowlkes, J., Bernardi, P., Bourdette, D. (2007). Cyclophilin D inactivation protects axons in experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(18), 7558–7563. [\[CrossRef\]](#)
23. Nicolli, A., Basso, E., Petronilli, V., Wenger, R. M., Bernardi, P. (1996). Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, a cyclosporin A-sensitive channel. *Journal of Biological Chemistry*, 271(4), 2185–2192. [\[CrossRef\]](#)
24. Wolinsky MS Study Group. (1990). Efficacy and toxicity of cyclosporine in chronic progressive multiple sclerosis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *Annals of Neurology*, 27(6), 591–605. [\[CrossRef\]](#)
25. Clarke, S.J., McStay, G.P., Halestrap, A.P. (2002). Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), 34793–34799. [\[CrossRef\]](#)
26. Azzolin, L., Antolini, N., Calderan, A., Ruzza, P., Sciacovelli, M., Marin, O., Mammi, S., Bernardi, P., Rasola, A. (2011). Antamanide, a derivative of amanita phalloides, is a novel inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. *PLoS ONE*, 6(1), 26–29. [\[CrossRef\]](#)
27. Dror, O., Schneidman-Duhovny, D., Inbar, Y., Nussinov, R., Wolfson, H.J. (2009). Novel approach for efficient pharmacophore-based virtual screening: Method and applications. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(10), 2333–2343. [\[CrossRef\]](#)
28. Koes, D.R., Camacho, C.J. (2012). ZINCPharmer: Pharmacophore search of the ZINC database. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), 409–414. [\[CrossRef\]](#)
29. 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, 1–13. [\[CrossRef\]](#)
30. Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., Bourne, P.E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242. [\[CrossRef\]](#)
31. Dassault Systèmes. (2019). *Discovery Studio Visualizer* (No. 2019). BIOVIA. [\[CrossRef\]](#)

32. Morris, G.M., Ruth, H., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., Olson, A.J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. [\[CrossRef\]](#)
33. Trott, O., Olson, A. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461. [\[CrossRef\]](#)
34. Huylu, B., Yalcin Ozkat, G. (2022). MS Hastalığının Tedavisine Yönelik Yeni Sfingosin-1-Fosfat Reseptör Modülatörlerinin Geliştirilmesi. *Konya Journal of Engineering Sciences*, 10(1), 102–114. [\[CrossRef\]](#)



POSSIBLE CARDIOPROTECTIVE MECHANISM OF ACTION OF DEXRAZOXANE, AND PROBABLE HUMAN TOPOISOMERASE II β INHIBITORS: AN *IN SILICO* ANALYSIS

*DEKSRAZOKSANIN OLASI KARDİYOPROTEKTİF ETKİ MEKANİZMASI VE MUHTEMEL
İNSAN TOPOİZOMERAZ IIB İNHİBİTÖRLERİ: İN SİLİCO ANALİZ*

Fuat KARAKUŞ^{1*} , Burak KUZU² 

¹Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Toxicology,
65080, Van, Turkey

²Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, 65080,
Van, Turkey

ABSTRACT

Objective: *The aim of this study was to determine which metabolite plays a role in the cardioprotective effect of dexrazoxane, and also to identify alternative compounds to dexrazoxane since clinical use of dexrazoxane is limited. For this purpose, the interactions of dexrazoxane and its three metabolites (B, C, and ADR-925), as well as the compounds, which reported to be inhibitors for topoisomerase VI (prototype of human DNA topoisomerase II beta), with human DNA topoisomerase II beta were investigated by molecular docking. Afterwards, the theoretical ADMET properties of all these compounds were determined*

Material and Method: *The molecular structures were optimized by Gaussview 05 and Gaussian 03 package programs. AutoDock 4.2 software was used for molecular docking studies and the docking complexes were analyzed in 2D and 3D using the Discovery Studio Client 4.1 program. The pkCSM online program was used to calculate the theoretical ADMET parameters.*

Result and Discussion: *As a result of molecular docking studies, it was determined that the B metabolite of dexrazoxane has a higher binding potential to human DNA topoisomerase II beta compared to both dexrazoxane and its other metabolites. The binding potentials of other compounds reported in the literature to human DNA topoisomerase II beta were radicicol>quinacrine>purpurin>9-Aminoacridine>hexylresorcinol, respectively.*

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Fuat Karakuş
e-mail / e-posta: fuatkarakus@yyu.edu.tr, **Phone / Tel.:** +90 432 444 5065 (21185)

The results showed that the B metabolite of dexrazoxane plays an important role in the cardioprotective mechanism of action of dexrazoxane against anthracycline cardiotoxicity. In addition, it has been determined that other compounds, except purpurin, have the potential to cause toxicity.

Keywords: Anthracycline cardiotoxicity, cardioprotective agents, dexrazoxane, *in silico* analysis, topoisomerase II inhibitors

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı deksrazoksanın kardioprotektif etkisinde hangi metabolitinin rol oynadığını belirlemek ve ayrıca deksrazoksanın klinik kullanımı sınırlı olduğu için deksrazoksana alternatif bileşikler saptamaktır. Bu amaçla, deksrazoksana ve üç metabolitinin (B, C, ve ADR-925) ve ayrıca literatürde topoizomerez VI (insan DNA topoizomerez II beta'nın prototipi) için inhibitör olduğu bildirilen bileşiklerin insan DNA topoizomerez II beta ile etkileşimleri moleküler kenetleme ile araştırıldı. Sonrasında tüm bu bileşiklerin teorik ADMET özellikleri belirlendi.

Gereç ve Yöntem: Moleküler yapılar Gaussview 05 ve Gaussian 03 paket programları ile optimize edildi. Moleküler kenetleme çalışmaları için AutoDock 4.2 yazılımı kullanıldı ve kenetleme kompleksleri Discovery Studio Client 4.1 programı kullanılarak 2D ve 3D olarak analiz edildi. Teorik ADMET parametrelerini hesaplamak için pkCSM çevrimiçi programı kullanıldı.

Sonuç ve Tartışma: Moleküler kenetleme çalışmaları sonucunda deksrazoksanın B metabolitinin, hem deksrazoksana hem de diğer metabolitlerine kıyasla insan DNA topoizomerez II beta'ya daha fazla bağlanma potansiyeli olduğu belirlendi. Literatürde bildirilen diğer bileşiklerin de insan DNA topoizomerez II beta'ya bağlanma potansiyelleri sırası ile radisikol>kinakrin>purpurin>9-Aminoakridin>heksilresorsinol şeklindeydi.

Sonuçlar, deksrazoksanın antrasiklin kardiyo toksisitesine karşı kardioprotektif etki mekanizmasında deksrazoksanın B metabolitinin önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Bunun yanında, araştırılan diğer bileşiklerden purpurin dışındakilerin toksisite oluşturma potansiyelleri olduğu da belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antrasiklin kardiyo toksisitesi, deksrazoksana, *in silico* analiz, kardioprotektif ajanlar, topoizomerez II inhibitörleri

INTRODUCTION

Anthracycline antibiotics (daunorubicin, doxorubicin, epirubicin, idarubicin, mitoxantron) have been widely used for many years in the treatment of solid and hematological tumors [1]. However, their clinical use are limited due to the severe cardiotoxic effects [2-4]. Reducing the cumulative dose of anthracycline is the main approach to preventing the cardiotoxicity, in addition, treatment with dexrazoxane (DEX), the only FDA-approved antidote, is recommended against some anthracycline-related cardiotoxicities and accidental anthracycline extravasation [5-8]. Clinical use of DEX, however, is limited due to concerns that it may increase the myelosuppressive effects of anthracyclines and ifosfamide [9] and it may also cause secondary malignancies after treatment for some pediatric cancers [10,11].

DEX (ICRF-187); is a (S)-4,4'-(1-methyl-1,2-ethanedyl) bis-2,6-piperazinedione and belongs to the bis-dioxopiperazines [12]. It is reported *in vitro* and *in vivo* studies that DEX was biotransformed to an EDTA-like ADR-925 active metabolite via two hydrolytic intermediates (metabolites B and C; Figure 1) [13-15].

Although it is accepted that ADR-925 protects cardiomyocytes by chelating increased intracellular iron as a result of anthracycline-induced oxidative damage, however, compounds that are stronger than DEX in terms of iron-chelating do not have a protective effect or have a less protective effect than DEX against anthracycline cardiotoxicity [15-18]. On the other hand, another mechanism that has come to the fore in recent years regarding the cardioprotective property of DEX is that it may

catalytically inhibit the topoisomerase II beta enzyme (topo II β) in cardiomyocytes [19-24], however, it is not yet known whether DEX or its metabolite(s) exert this inhibition.

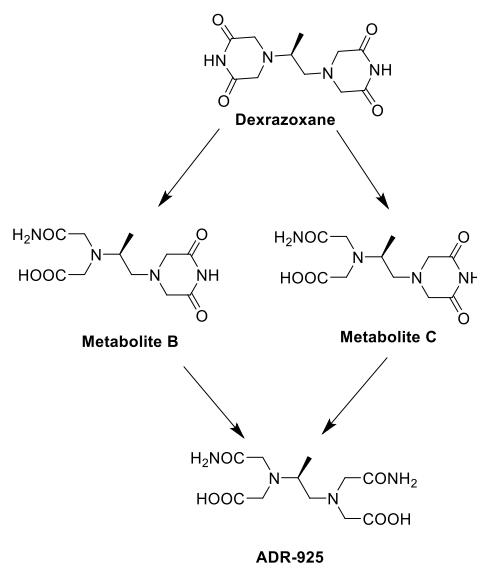


Figure 1. Biotransformation of Dexrazoxane (ICRF-187). (The molecular structures were drawn by ChemOffice Suite V20.1.1 software).

In the present study, we focused on the question that which metabolite(s) or DEX itself inhibits topo II β and plays a role in the cardioprotective effect. For this purpose, we performed molecular docking studies to determine the interaction of DEX and its three metabolites (Figure 1) with human DNA topoisomerase II alpha (topo II α) and topo II β enzymes. In addition, we also performed the docking studies for topo II α and topo II β of five of the reported compounds (Figure 2; hexylresorcinol, purpurin, radicicol, quinacrine, 9-Aminoacridine) to be inhibitors against topo VI, a type of topo II β , found in both prokaryotes and some eukaryotes such as plants and algae [25-28]. Finally, we also investigated the some ADMET properties of these five compounds to find nontoxic possible topo II β inhibitors as well as the docking studies.

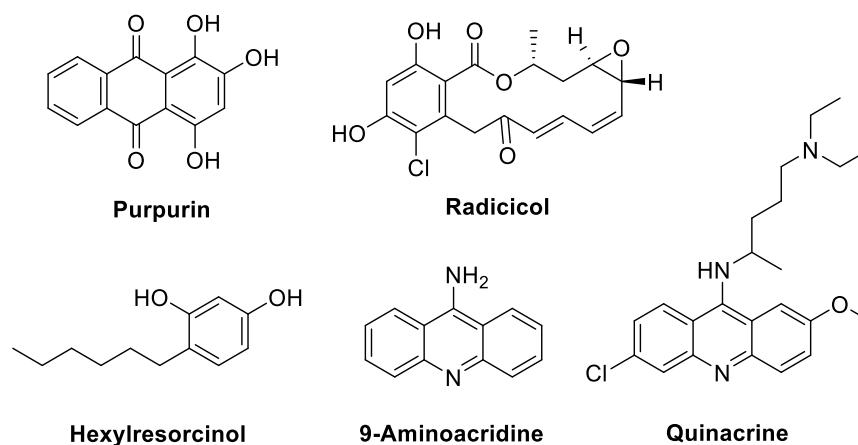


Figure 2. Chemical structures of possible five inhibitors of human topo II β . (The molecular structures were drawn by ChemOffice Suite V20.1.1 software)

MATERIAL AND METHOD

Molecular docking studies of human topo II α and topo II β enzymes

Molecular docking studies were conducted using AutoDock 4.2 software to identify the interactions of nine compounds with topo II α and topo II β . Crystal structures of human topo II α (PDB ID; 1ZXN) [29] and topo II β (PDB ID; 3QX3) [30] were obtained from the RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org). The molecular structure of the compounds was designed using Gaussview 5.0 and later optimized using the Gaussian 03 package based on the theoretical level of the B3LYP method and the 6–31G basis set. To find potential binding sites between topo II enzymes of the optimized molecular structures, active sites were determined from the interaction map of the ligands, which the enzymes made complexes in the crystal structure and docking studies were performed for the identified active regions.

The validation of molecular docking studies was performed for both topo II α and topo II β enzymes. The fact that the Cluster RMSD (Root-mean-square Deviation) value calculated in the docking validation is in the range of 0-2 Å indicates that the docking operation is valid. The docking method was also optimized by re-docking of co-crystallized ligands into the binding site of target proteins. For re-dock method, the native ligands Adenine diphosphate and Etoposide were docked into their binding site on 1ZXN and 3QX3 PDB codes, respectively. The RMSD values of the re-docked ligands were calculated on DockRMSD online software (<https://zhanggroup.org/DockRMSD/>) and RMSD values of the ligands found as 1.951 Å, and 1.352 Å respectively.

In DNA docking studies x: 51.354; y: -3.049; z: 78.946 for topo II α , and x: 26.813; y: 105.382; z: 37.638 for topo II β were determined as coordinate centers. Then, using a grid box with 50×50×50 points at the center of the predicted locations and a grid point spacing of 0.375 Å, the lowest placed conformations were selected for further studies. Water molecules were removed with AutoDock tools and subsequently polar hydrogen atoms, Gasteiger partial charges, and Kollman charges were added to the targets. Additionally, the rotatable bonds of the compounds were adjusted. Lamarckian genetic algorithm approach was applied in both simulations. The interactions of topo II α and topo II β with the compounds were analyzed using the Discovery Studio Client 4.1 program.

Theoretical pharmacokinetic study for possible human topo II α and topo II β inhibitors

Theoretical some ADMET information of the compounds were also calculated by using the pkCSM program [31]. LogP, Caco-2 permeability, and small intestine absorption represent the lipophilicity, the apparent predicted intestinal permeability, and the percent absorption of the compounds (Intest. Abs.%), respectively. Steady-state volume of distribution (VD_{ss}) means drug distribution in the body and the fraction unbound (F_u) shows portion of free drug in plasma. Excretion of the compounds are predicted via the total clearance (Total C) and whether substrate for kidney OCT2 (organic cation transporter 2). The hERG (the human Ether-à-go-go-Related Gene) I-II inhibition, hepatotoxicity, and skin sensitization represent the toxicity of the compounds.

RESULT AND DISCUSSION

Binding affinity of the ligands to topo II α and topo II β

In the validation of molecular docking of topo II α ; ADP (Adenine diphosphate) ligand with 1ZXN PDB ID code obtained from the protein data bank. The docking was done in the grid box created for the target region. It was determined that the cluster RMSD value of the ligand molecule, which was tested with 10 different conformations, was 1.67 Å. For topo II β validation, Etoposide ligand with 3QX3 PDB ID code obtained from the protein data bank and the docking was done in the grid box created for the target region. The cluster RMSD value of the ligand molecule, which was tested with 10 different conformations, was 0.47 Å. It was determined that the ligand compounds docking for the determined target region of both enzymes had compatible RMSD values. The clustering histogram and RMSD tables have been added to supplementary information (Suppl. Table 1 and 2).

The binding studies with topo II α and topo II β were conducted by docking the compounds with the 1ZXN and 3QX3 crystal structures. The binding energies of the compounds were in the range of -3.47 to -8.22 kcal/mol for topo II α , and -3.75 to -10.77 kcal/mol for topo II β (Table 1).

Table 1. Docking scores of the compounds with topo II enzymes

Compounds	Topoisomerase II α (PDB ID: 1ZXN)			Topoisomerase II β (PDB ID: 3QX3)		
	Binding Energy (kcal/mol)	Ligand efficiency	Inh. con. (μ M)	Binding Energy (kcal/mol)	Ligand efficiency	Inh. con. (μ M)
DEX	-6.63	-0.35	13.7	-5.88	-0.31	49.36
B	-5.16	-0.26	165.8	-5.66	-0.28	71.27
C	-5.08	-0.25	187.55	-5.46	-0.27	99.8
ADR-925	-3.47	-0.17	2870	-3.75	-0.18	1790
Quinacrine	-6.83	-0.24	9.83	-8.70	-0.31	0.417
9-Aminoacridine	-6.50	-0.43	17.08	-7.21	-0.48	5.22
Purpurin	-7.35	-0.39	4.1	-8.14	-0.43	1.08
Hexylresorcinol	-5.67	-0.41	70.35	-6.30	-0.45	24.09
Radicalol	-8.22	-0.33	0.936	-10.77	-0.43	0.013

The efficiency of the docking conformations of the ligands and the theoretically calculated inhibition concentrations are also shown in Table 1. The results indicated that DEX's metabolites B (Figure 4) and C (Figure 5) have a higher binding affinity for topo II β and metabolite B has greater binding affinity than C (Table 1), while DEX itself has a higher binding affinity for topo II α (Table 1, Figure 3). It was also found that other five compounds (hexylresorcinol, purpurin, quinacrine, radicalol, 9-Aminoacridine) have a higher potential to inhibit topo II β than topo II α . The binding potentials of these compounds to human topo II β were radicalol>quinacrine>purpurin>9-Aminoacridine>hexylresorcinol, respectively (Table 1, Suppl. Figure 6-10).

In addition, 2D interaction of the compounds with the active site in the target enzymes was analyzed to elucidate their interactions. Hydrogen bonding and other non-covalent interactions are

shown in Table 2. It was found that the compounds generally form H-bonds with ALA167, ASN91, SER148, and non-covalent interactions with ILE141, PHE142, and MG900 in 2D interactions with topo II α . These amino acids are the interacting residues of the topo II α in their complex with the ADP ligand [29]. On the other hand, it was found that the compounds generally form H-bonds with ASP479, ARG503, and non-covalent interactions with ARG503, DC8, and DT9 in 2D interactions of the compounds with topo II β .

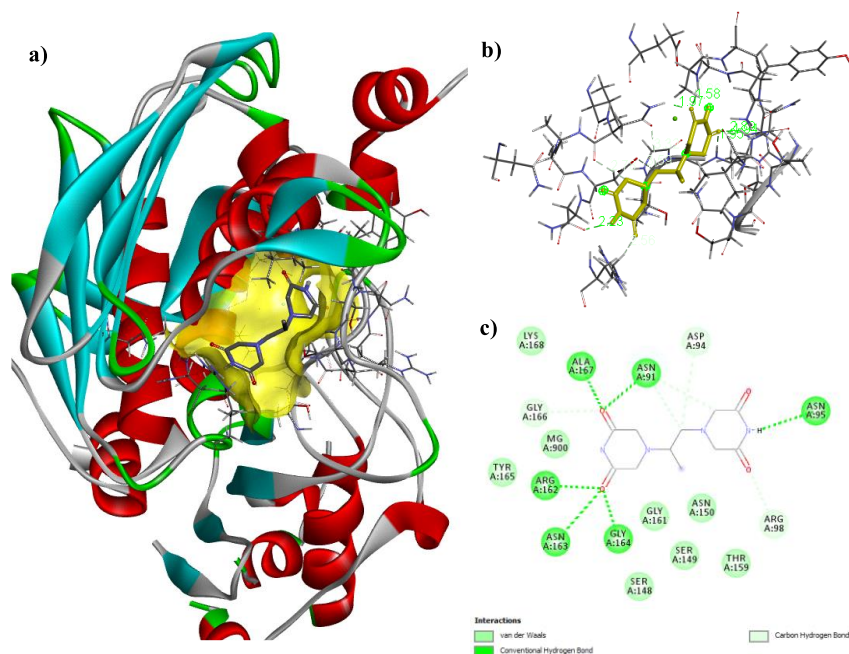


Figure 3. The 3D and 2D docking mode of DEX with topo II α (PDB ID:1ZXN). a) 3D structure of the enzyme-ligand complex b) 3D ligand interactions c) 2D ligand interactions (Note :a, b, and c indicate the same expressions in figures 4 and 5).

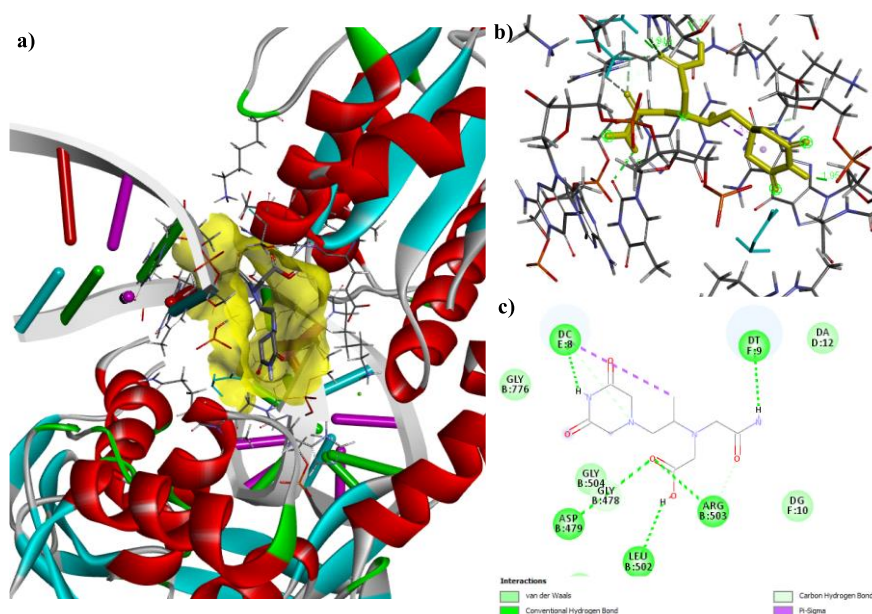


Figure 4. The 3D and 2D docking mode of metabolite B with topo II β (PDB ID:3QX3).

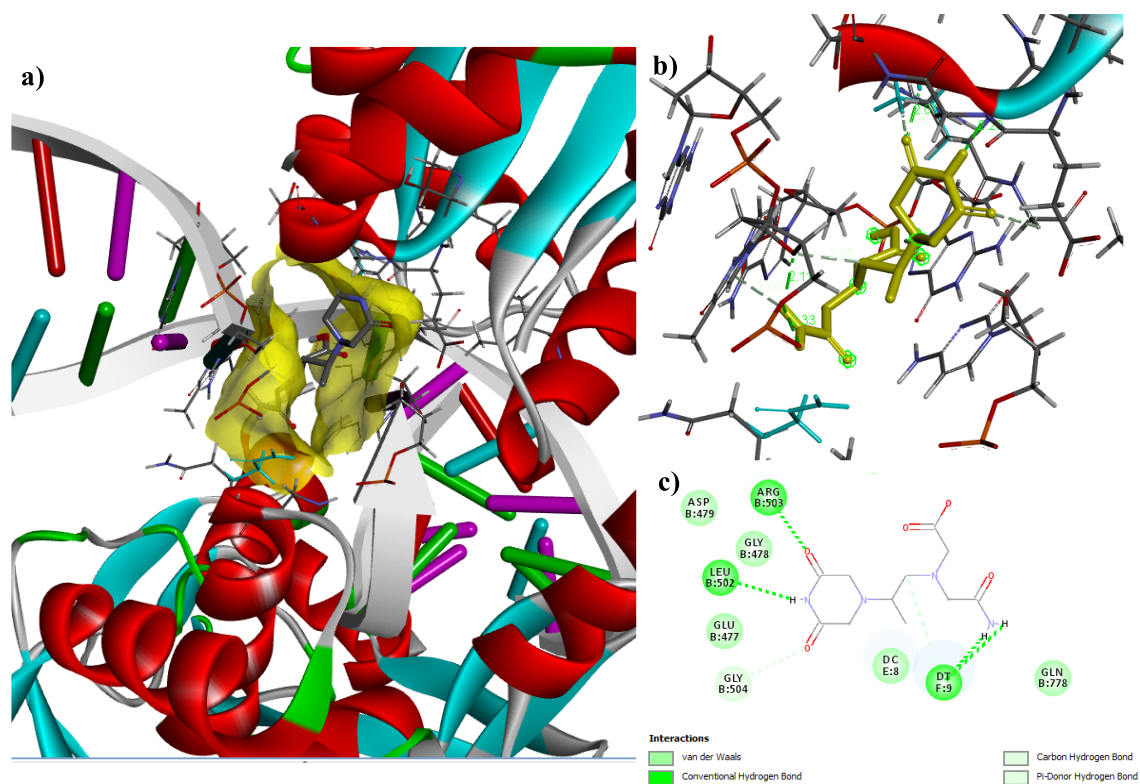


Figure 5. The 3D and 2D docking mode of metabolite C with topo II β (PDB ID:3QX3).

ADMET properties of the compounds that are potential human topo II inhibitors

The results of some ADMET parameters (Caco-2 permeability, intestinal absorption, VDss, Fu, total C, the substrate for kidney OCT2, hERG I/II inhibition, hepatotoxicity, skin sensitization) of the compounds are shown in Table 3.

According to the ADMET results, the log P values of the compounds, except for quinacrine, seem to comply with Lipinski rules [32]. The obtained results showed that hexylresorcinol, quinacrine, radicicol, and 9-aminoacridine have suitable for Caco-2 permeability. DEX and purpurin seem like Caco-2 impermeable however their intestinal absorption was 51% and 73%, respectively (less than 30% indicates poor absorption). Intestinal absorptions of the other four compounds ranged from 81% to 95% (Table 3).

The results from the theoretical distribution of the compounds in the body (VDss) showed that they, except for DEX, are found in plasma rather than in tissues (VDss is considered low if it is <0.15 and high if it is >0.45). In this context, the Fu values (indicate the free fraction of the compounds in plasma) of the compounds other than DEX were found to be low which means that the compounds' binding rates to plasma proteins increase (Table 3).

Table 2. Docking interactions of the compounds with human topo II enzymes

Compounds	Topoisomerase II α (PDB ID: 1ZXX)		Topoisomerase II β (PDB ID: 3QX3)	
	H-bonding	Other non-covalent interactions	H-bonding	Other non-covalent interactions
DEX	ALA167, ASN91, ASN95, ARG162, ASN163, GLY164,	ARG98, GLY166, ASP94	ASP479, GLN778, DC8	DC8, ARG503, GLY478
B	ASN120, ILE141, ASP94, ASN91, ALA167	PHE142, ILE141, ASN91, MG900	DC8, DT9, ASP479, ARG503, LEU502	DC8
C	LYS168, ALA167, ILE141, ASN163, GLY164, ARG162, ASN91	GLY161, MG900	ARG503, LEU502, DT9	GLY504, DT9
ADR-925	SER148, SER149, LYS168, ALA167, GLY164, ILE141, ASN163, ARG162	MG900, ASN91, THR147	DC8, DG10, DT9, ARG503, ASP479	DT9, GLY504
Hexylresorcinol	SER148, ARG162, ASN91, ALA167	ILE141, PHE142, MG900, GLY166	DT9, ASP479	DG13, DA12, ARG503, GLY478
Purpurin	ALA167, ASN91, GLU87, SER149, SER148, ASN150	ILE141, PHE142, LYS168, MG900	DG10, ASP479, DC8	ARG503, SER480
Quinacrine	ASN91	ALA92, ALA167, ILE141, ILE125, ARG98	ARG503	DT9, DG13, DA12, DC8
Radicol	LYS168, GLY161, ASP94	PHE142, ALA167, ARG98	ASP479	DA12, DG13, ARG503, DC8, DG10
9-Aminoacridine	ASN91, ALA167, SER148	MG900, LYS168, PHE142, ILE141	ASP479, DT9	ARG503, DT9

The clearance results suggested that the compounds were not substrate for OCT2, which is a renal transporter that plays an important role in the disposition and renal clearance of xenobiotics and endogenous compounds. Total clearance of the compounds was between 0.056 and 1.099 log mL/min/kg (Table 3).

Another important ADMET parameter for xenobiotics is the inhibition of hERG because it encodes a subunit of a potassium ion channel which regulates the cardiac action potential. Inhibition of hERG can lead to acquiring long QT syndrome and fatal ventricular arrhythmia [33]. The results indicated that the compounds, except for quinacrine, do not inhibit hERG I/II. In addition, according to other theoretical toxicity results, radicol and quinacrine can potentially cause hepatotoxicity, while 9-aminoacridine and hexylresorcinol can produce skin sensitization. On the other hand, purpurin theoretically does not cause any toxicity (Table 3).

Possible cardioprotective mechanism of DEX

In recent years, it has been suggested that DEX's cardioprotective mechanism depends on inhibiting topo II β , which is expressed higher than topo II α in the heart, rather than chelates increased free iron by oxidative stress in cardiomyocytes caused by anthracycline treatment [15-24]. Since DEX is administered at the clinic as an intravenous infusion, it is rapidly distributed to the heart and then to

the whole body. VD_{ss} and Fu results also showed that DEX can be found in tissues rather than plasma after the treatment. An *in vivo* study was shown that DEX reaches the heart and it is biotransformed into its metabolites B, C and ADR-925 [15]. Similar biotransformation results were also obtained from *in vitro* studies [13, 14]. The biotransformation of DEX to a large extent in the heart rather than the liver may play a role in the cardioprotective effect because one or two its metabolite(s) may inhibit the topo II β . The molecular docking studies indicated that DEX has a greater binding affinity for topo II α (Figure 3) while its metabolites (B and C) to topo II β (Table 1, Figure 4, and 5). In addition, DEX's ADR-925 metabolite, which is reported to play main role in the cardioprotective effect by chelating increased iron, had a low binding affinity for both topo II α (Table 1, Suppl. Figure 4) and topo II β (Table 1, Suppl. Figure 5). As the B metabolite of DEX has a greater binding affinity to topo II β (Figure 4) than topo II α (Suppl. Figure 2) and theoretically inhibits the enzyme at lower concentrations (IC: 71.27 μ M) by comparison the C metabolite of DEX (IC: 99.8 μ M), the B metabolite of DEX may play a role in the cardioprotective effect against anthracycline-induced cardiotoxicity.

Table 3. Theoretical pharmacokinetic study for ADMET properties

Compounds	Log P	Caco2 permeability	Human intestinal abs. (%)	VD _{ss} (human)	Fu (human)	Total C (log mL/min/kg)	Renal OCT2 Substrate	hERG I/II	Hepatotoxicity	Skin Sensitive
DEX	-2.70	-0.089	51	-0.17	0.89	0.972	No	No	No	No
Purpurin	1.58	-0.32	73	0.11	0.16	0.056	No	No	No	No
Radicicol	2.69	1.103	83	0.24	0.297	0.321	No	No	Yes	No
Quinacrine	5.97	1.00	91	1.71	0.124	1.099	No	I-No, II-Yes	Yes	No
9-Aminoacridine	2.97	1.31	95	0.25	0.17	0.613	No	No	No	Yes
Hexylresorcinol	3.22	1.33	91	0.37	0.357	0.349	No	No	No	Yes

Probable and nontoxic human topo II β inhibitors

The compounds reported in the literature to be inhibitors (hexylresorcinol, purpurin, quinacrine, radicol, and 9-Aminoacridine) for topo VI, a prototypical topo II β , were also investigated whether it would inhibit human topo II β . Because both some recent publications [19-24], and our results suggested that inhibition of topo II β plays a key role in the cardioprotective effect of DEX. On the other hand, since DEX has limited clinical use due to some adverse effects [10, 11], theoretical toxicities of these compounds were also investigated to determine whether they could be an alternative to DEX. Although radicol and quinacrine are the first two compounds with the highest binding affinity to topo II β among alternative compounds, they have the potential to produce hepatotoxicity and quinacrine can also induce cardiotoxicity by inhibiting hERG I/II according to our *in silico* ADMET results. Human hepatotoxicity of quinacrine was also reported in the literature [35, 36], but there is no study related to cardiotoxicity. No toxicity has been reported with radicol either. In contrast, it has been reported to ameliorate

crotoxin-damaged skeletal muscle in mice [37, 38]. On the other hand, purpurin, which is the third highest binding potential to human topo II β , does not cause any toxicity and it inhibits human topo II β at a low concentration of 1.08 μ M (Table 1). At the same time, there is no report related to purpurin toxicity. On the contrary, *in vitro*, and *in vivo* studies have been reported that it has antioxidant, antimicrobial, anticancer, and neuroprotective effects [39]. 9-aminoacridine and hexylresorcinol, which have less binding affinity for topo II β than the other compounds, are also likely to cause toxicity (skin sensitization, Table 3). This toxic effect has also been reported in a case report [40].

The results of the *in silico* study showed that metabolite B plays a role in the cardioprotective mechanism of action of DEX by inhibiting topo II β . It has also shown that the compounds previously known to be inhibitors of topo VI may be inhibitors of both human topo II enzymes at lower concentrations compared to both DEX and its metabolites. Based on our results, compounds other than purpurin are likely to cause toxicity. On the other hand, no toxicity of purpurin was observed in this study and also in the literature according to the literature search carried out until March 10.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

Conception: F.K.; Design: F.K., B.K.; Supervision: F.K.; Resources: F.K., B.K.; Materials: B.K.; Data Collection and/or processing: B.K., F.K.; Analysis and/or interpretation: B.K., F.K.; Literature search: F.K., B.K.; Writing manuscript: F.K., B.K.; Critical review: F.K., B.K.; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no actual, potential or perceived conflicts of interest.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

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

REFERENCES

1. Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56(2), 185–229. [\[CrossRef\]](#)
2. Lefrak, E. A., Pitha, J., Rosenheim, S., Gottlieb, J. A. (1973). A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer*, 32(2), 302–314. [\[CrossRef\]](#)
3. Gerber, M. A., Gilbert, E. M., Chung, K. J. (1975). Adriamycin cardiotoxicity in a child with Wilms tumor. Report of a case and review of the literature. *The Journal of Pediatrics*, 87(4), 629–632. [\[CrossRef\]](#)

4. McGowan, J. V., Chung, R., Maulik, A., Piotrowska, I., Walker, J. M., Yellon, D. M. (2017). Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 31(1), 63–75. [[CrossRef](#)]
5. Von Hoff, D. D., Layard, M. W., Basa, P., Davis, H. L., Jr, Von Hoff, A. L., Rozenzweig, M., Muggia, F.M. (1979). Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Annals of Internal Medicine*, 91(5), 710–717. [[CrossRef](#)]
6. Wouters, K. A., Kremer, L. C., Miller, T. L., Herman, E. H., Lipshultz, S. E. (2005). Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies. *British Journal of Haematology*, 131(5), 561–578. [[CrossRef](#)]
7. Hasinoff, B. B. (2006). Dexrazoxane use in the prevention of anthracycline extravasation injury. *Future Oncology* (London, England), 2(1), 15–20. [[CrossRef](#)]
8. Speyer, J. L., Green, M. D., Kramer, E., Rey, M., Sanger, J., Ward, C., Dubin, N., Ferrans, V., Stecy, P., Zeleniuch-Jacquotte, A. (1988). Protective effect of the bispiperazinedione ICRF-187 against doxorubicin-induced cardiac toxicity in women with advanced breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 319(12), 745–752. [[CrossRef](#)]
9. Spalato Ceruso, M., Napolitano, A., Silletta, M., Mazzocca, A., Valeri, S., Improta, L., Santini, D., Tonini, G., Badalamenti, G., Vincenzi, B. (2019). Use of Cardioprotective Dexrazoxane Is Associated with Increased Myelotoxicity in Anthracycline-Treated Soft-Tissue Sarcoma Patients. *Chemotherapy*, 64(2), 105–109. [[CrossRef](#)]
10. Vrooman, L. M., Neuberg, D. S., Stevenson, K. E., Asselin, B. L., Athale, U. H., Clavell, L., Cole, P. D., Kelly, K. M., Larsen, E. C., Laverdière, C., Michon, B., Schorin, M., Schwartz, C. L., Cohen, H. J., Lipshultz, S. E., Silverman, L. B., Sallan, S. E. (2011). The low incidence of secondary acute myelogenous leukaemia in children and adolescents treated with dexrazoxane for acute lymphoblastic leukaemia: a report from the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium. *European Journal of Cancer*, 47(9), 1373–1379. [[CrossRef](#)]
11. Walker, D. M., Fisher, B. T., Seif, A. E., Huang, Y. S., Torp, K., Li, Y., Aplenc, R. (2013). Dexrazoxane use in pediatric patients with acute lymphoblastic or myeloid leukemia from 1999 and 2009: analysis of a national cohort of patients in the Pediatric Health Information Systems database. *Pediatric Blood and Cancer*, 60(4), 616–620. [[CrossRef](#)]
12. Hellmann, K, Rhomberg, W. Razoxane and Dexrazoxane – Two Multifunctional Agents: Experimental and Clinical Results, Springer, London, (2010).
13. Hasinoff, B. B. (1989). The interaction of the cardioprotective agent ICRF-187 [(+)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane]; its hydrolysis product (ICRF-198); and other chelating agents with the Fe(III) and Cu(II) complexes of adriamycin. *Agents and Actions*, 26(3-4), 378–385. [[CrossRef](#)]
14. Hasinoff, B. B., Venkataram, S., Singh, M., Kuschak, T.I. (1994). Metabolism of the cardioprotective agents dexrazoxane (ICRF-187) and levrazoxane (ICRF-186) by the isolated hepatocyte. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 24(10), 977–987. [[CrossRef](#)]
15. Jirkovský, E., Jirkovská, A., Bureš, J., Chládek, J., Lenčová, O., Stariat, J., Pokorná, Z., Karabanovich, G., Roh, J., Brázdová, P., Šimůnek, T., Kovaříková, P., Štěrba, M. (2018). Pharmacokinetics of the Cardioprotective Drug Dexrazoxane and Its Active Metabolite ADR-925 with Focus on Cardiomyocytes and the Heart. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 364(3), 433–446. [[CrossRef](#)]

16. Hasinoff, B. B., Hellmann, K., Herman, E. H., Ferrans, V. J. (1998). Chemical, biological and clinical aspects of dexrazoxane and other bisdioxopiperazines. *Current Medicinal Chemistry*, 5(1), 1-28.
17. Šimůnek, T., Klimentová, I., Kaplanová, J., Sterba, M., Mazurová, Y., Adamcová, M., Hrdina, R., Gersl, V., Ponka, P. (2005). Study of daunorubicin cardiotoxicity prevention with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone in rabbits. *Pharmacological Research*, 51(3), 223–231. [\[CrossRef\]](#)
18. Sterba, M., Popelová, O., Šimunek, T., Mazurová, Y., Potáčová, A., Adamcová, M., Kaiserová, H., Ponka, P., Gersl, V. (2006). Cardioprotective effects of a novel iron chelator, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone, in the rabbit model of daunorubicin-induced cardiotoxicity. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319(3), 1336–1347. [\[CrossRef\]](#)
19. Lyu, Y. L., Kerrigan, J. E., Lin, C. P., Azarova, A. M., Tsai, Y. C., Ban, Y., Liu, L. F. (2007). Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Research*, 67(18), 8839–8846. [\[CrossRef\]](#)
20. Deng, S., Yan, T., Jendry, C., Nemecek, A., Vincetic, M., Gödtel-Armbrust, U., Wojnowski, L. (2014). Dexrazoxane may prevent doxorubicin-induced DNA damage via depleting both topoisomerase II isoforms. *BMC Cancer*, 14, 842. [\[CrossRef\]](#)
21. Vejpongsa, P., Yeh, E. T. (2014). Topoisomerase 2 β : a promising molecular target for primary prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 95(1), 45–52. [\[CrossRef\]](#)
22. Hasinoff, B. B., Patel, D., Wu, X. (2020). The Role of Topoisomerase II β in the Mechanisms of Action of the Doxorubicin Cardioprotective Agent Dexrazoxane. *Cardiovascular Toxicology*, 20(3), 312–320. [\[CrossRef\]](#)
23. Hasinoff, B. B., Patel, D., Wu, X. (2020). A QSAR study that compares the ability of bisdioxopiperazine analogs of the doxorubicin cardioprotective agent dexrazoxane (ICRF-187) to protect myocytes with DNA topoisomerase II inhibition. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 399, 115038. [\[CrossRef\]](#)
24. Jirkovský, E., Jirkovská, A., Bavlovič-Piskáčková, H., Skalická, V., Pokorná, Z., Karabanovich, G., Kollárová-Brázdová, P., Kubeš, J., Lenčová-Popelová, O., Mazurová, Y., Adamcová, M., Lyon, A. R., Roh, J., Šimůnek, T., Štěrbová-Kovaříková, P., Štěrba, M. (2021). Clinically Translatable Prevention of Anthracycline Cardiotoxicity by Dexrazoxane Is Mediated by Topoisomerase II Beta and Not Metal Chelation. *Circulation: Heart Failure*, 14(11), e008209. [\[CrossRef\]](#)
25. Gabelle, D., Bocs, C., Graille, M., Forterre, P. (2005). Inhibition of archaeal growth and DNA topoisomerase VI activities by the Hsp90 inhibitor radicicol. *Nucleic Acids Research*, 33(7), 2310–2317. [\[CrossRef\]](#)
26. Taylor, J. A., Mitchenall, L. A., Rejzek, M., Field, R. A., Maxwell, A. (2013). Application of a novel microtitre plate-based assay for the discovery of new inhibitors of DNA gyrase and DNA topoisomerase VI. *PloS one*, 8(2), e58010. [\[CrossRef\]](#)
27. Bergerat, A., Gabelle, D., Forterre, P. (1994). Purification of a DNA topoisomerase II from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae*. A thermostable enzyme with both bacterial and eucaryal features. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(44), 27663–27669. [\[CrossRef\]](#)

28. Sugimoto-Shirasu, K., Stacey, N. J., Corsar, J., Roberts, K., McCann, M. C. (2002). DNA topoisomerase VI is essential for endoreduplication in Arabidopsis. *Current Biology:CB*, 12(20), 1782–1786. [\[CrossRef\]](#)
29. Wei, H., Ruthenburg, A. J., Bechis, S. K., Verdine, G. L. (2005). Nucleotide-dependent domain movement in the ATPase domain of a human type IIA DNA topoisomerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(44), 37041–37047. [\[CrossRef\]](#)
30. Wu, C. C., Li, T. K., Farh, L., Lin, L.Y., Lin, T. S., Yu, Y. J., Yen, T. J., Chiang, C. W., Chan, N. L. (2011). Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide. *Science* (New York, N.Y.), 333(6041), 459–462. [\[CrossRef\]](#)
31. Pires, D. E., Blundell, T. L., Ascher, D. B. (2015). pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(9), 4066–4072. [\[CrossRef\]](#)
32. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), 3–26. [\[CrossRef\]](#)
33. Sanguinetti, M. C., Tristani-Firouzi, M. (2006). hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature*, 440(7083), 463–469. [\[CrossRef\]](#)
34. Gadelle, D., Graille, M., Forterre, P. (2006). The HSP90 and DNA topoisomerase VI inhibitor radicicol also inhibits human type II DNA topoisomerase. *Biochemical Pharmacology*, 72(10), 1207–1216. [\[CrossRef\]](#)
35. Gibb, W., Isenberg, D. A., Snaith, M. L. (1985). Mepacrine induced hepatitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 44(12), 861–862. [\[CrossRef\]](#)
36. Scoazec, J. Y., Krolak-Salmon, P., Casez, O., Besson, G., Thobois, S., Kopp, N., Perret-Liaudet, A., Streichenberger, N. (2003). Quinacrine-induced cytolytic hepatitis in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Annals of Neurology*, 53(4), 546–547. [\[CrossRef\]](#)
37. Conte, T. C., Franco, D. V., Baptista, I. L., Bueno, C. R., Jr, Selistre-de-Araújo, H. S., Brum, P. C., Moriscot, A. S., Miyabara, E. H. (2008). Radicicol improves regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin in mice. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 52(1), 146–155. [\[CrossRef\]](#)
38. Nascimento, T. L., Conte, T. C., Rissato, T. S., Luna, M. S., Soares, A. G., Moriscot, A. S., Yamanouye, N., Miyabara, E. H. (2019). Radicicol enhances the regeneration of skeletal muscle injured by crotoxin via decrease of NF-kB activation. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 167, 6–9. [\[CrossRef\]](#)
39. Singh, J., Hussain, Y., Luqman, S., Meena, A. (2020). Purpurin: A natural anthraquinone with multifaceted pharmacological activities. *Phytotherapy Research:PTR*, 10.1002/ptr.6965. Advance online publication. [\[CrossRef\]](#)
40. Burrows, D., Irvine, J. (1982). Contact dermatitis to hexylresorcinol. *Contact Dermatitis*, 8(1), 71. [\[CrossRef\]](#)

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table 1. The cluster histogram and RMSD table for topo II α (PDB ID: 1ZZN)

CLUSTERING HISTOGRAM												
Clus-ter Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram							
					5	10	15	20	25	30	35	
1	-8.37	9	-8.37	1	#							
2	-8.33	6	-7.90	8	#####							
3	-7.93	3	-7.93	1	#							

Number of multi-member conformational clusters found = 1, out of 10 runs.

RMSD TABLE						
Rank	Sub-Rank	Run	Binding Energy	Cluster RMSD	Reference RMSD	Grep Pattern
1	1	9	-8.37	0.00	3.13	RANKING
2	1	6	-8.33	0.00	1.54	RANKING
2	2	4	-8.13	1.76	2.21	RANKING
2	3	10	-8.05	1.67	0.99	RANKING
2	4	2	-8.01	1.85	1.74	RANKING
2	5	7	-7.96	1.85	2.47	RANKING
2	6	8	-7.94	1.58	1.62	RANKING
2	7	1	-7.61	1.66	1.91	RANKING
2	8	5	-7.21	1.75	1.55	RANKING
3	1	3	-7.93	0.00	2.85	RANKING

Table 2. The cluster histogram and RMSD table for topo II β (PDB ID: 3QX3)

CLUSTERING HISTOGRAM												
Clus-ter Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram							
					5	10	15	20	25	30	35	
1	-13.58	4	-13.39	8	#####							
2	-12.55	1	-12.48	2	##							

Number of multi-member conformational clusters found = 2, out of 10 runs.

RMSD TABLE						
Rank	Sub-Rank	Run	Binding Energy	Cluster RMSD	Reference RMSD	Grep Pattern
1	1	4	-13.58	0.00	16.73	RANKING
1	2	9	-13.54	0.12	16.72	RANKING
1	3	5	-13.53	0.17	16.70	RANKING
1	4	3	-13.52	0.27	16.68	RANKING
1	5	2	-13.52	0.27	16.69	RANKING
1	6	7	-13.49	0.31	16.74	RANKING
1	7	10	-13.43	0.47	16.57	RANKING
1	8	8	-12.50	1.58	16.61	RANKING
2	1	1	-12.55	0.00	16.38	RANKING
2	2	6	-12.40	1.10	16.39	RANKING

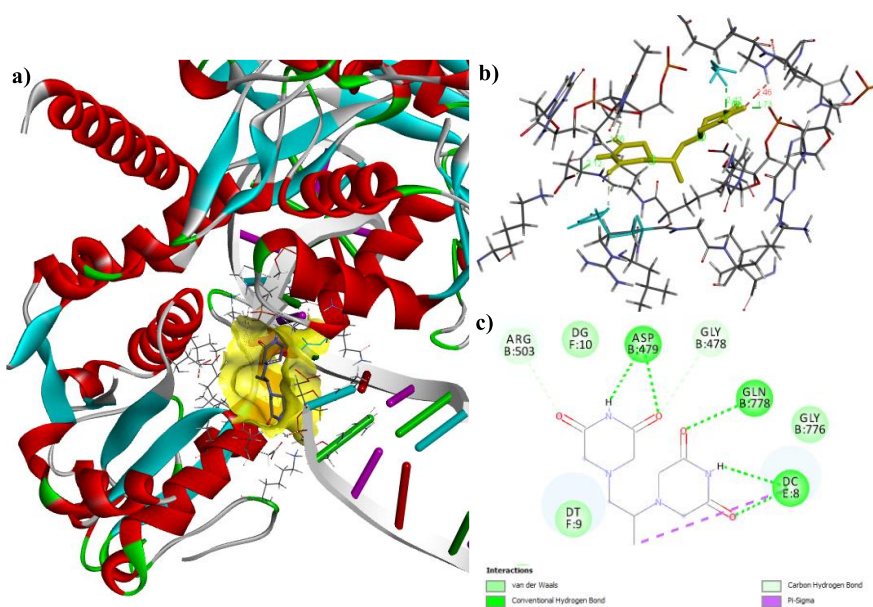


Figure 1. The 3D and 2D docking mode of DEX with topo II β (PDB ID:3QX3). a) 3D structure of the enzyme-ligand complex b) 3D ligand interactions c) 2D ligand interactions (Note :a, b, and c indicate the same expressions from figures 2 to 10)

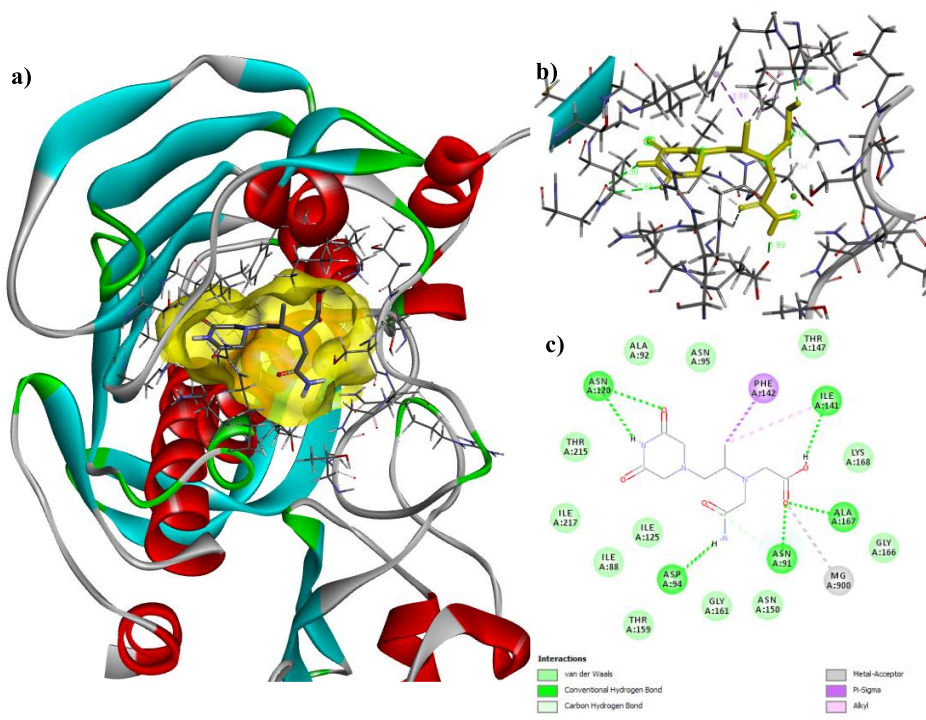


Figure 2. The 3D and 2D docking mode of metabolite B with topo IIα (PDB ID:1ZXN).

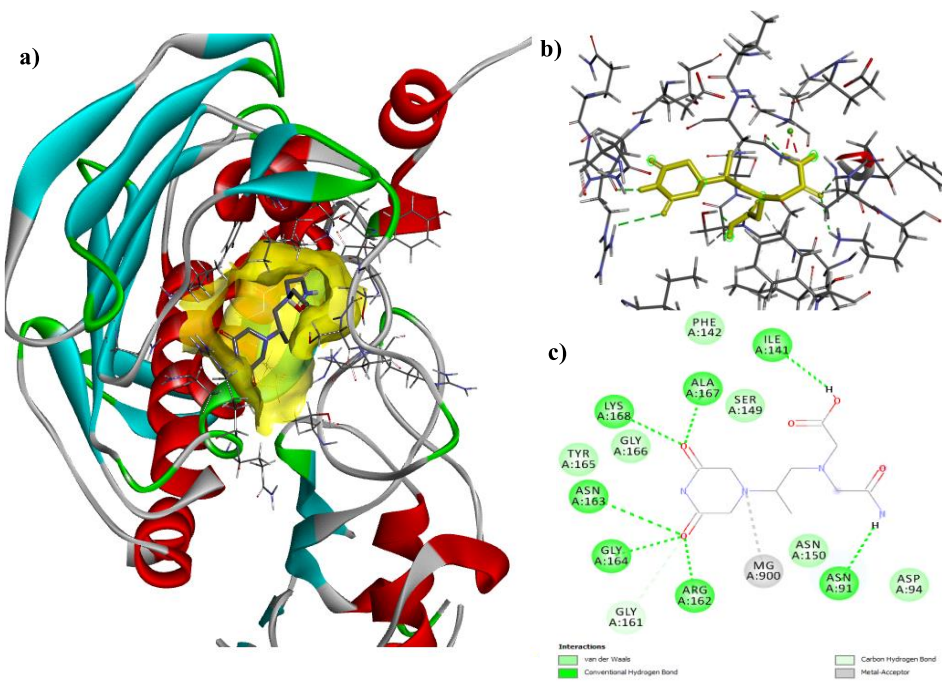


Figure 3. The 3D and 2D docking mode of metabolite C with topo IIα (PDB ID:1ZXN).

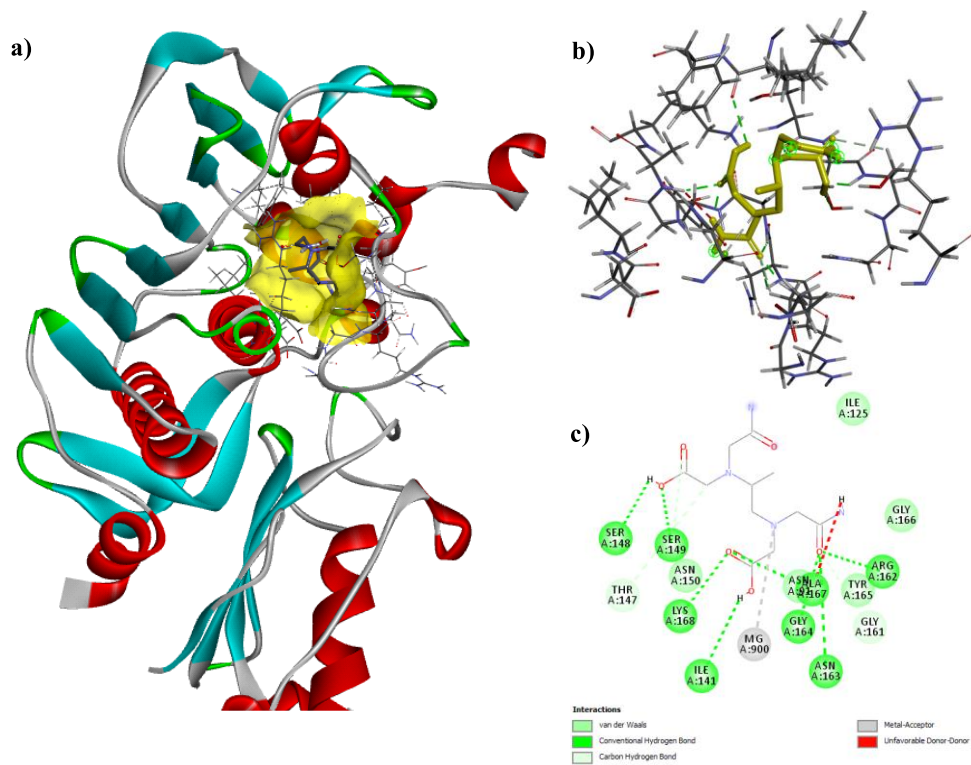


Figure 4. The 3D and 2D docking mode of metabolite ADR-925 with topo II α (PDB ID:1ZXN).

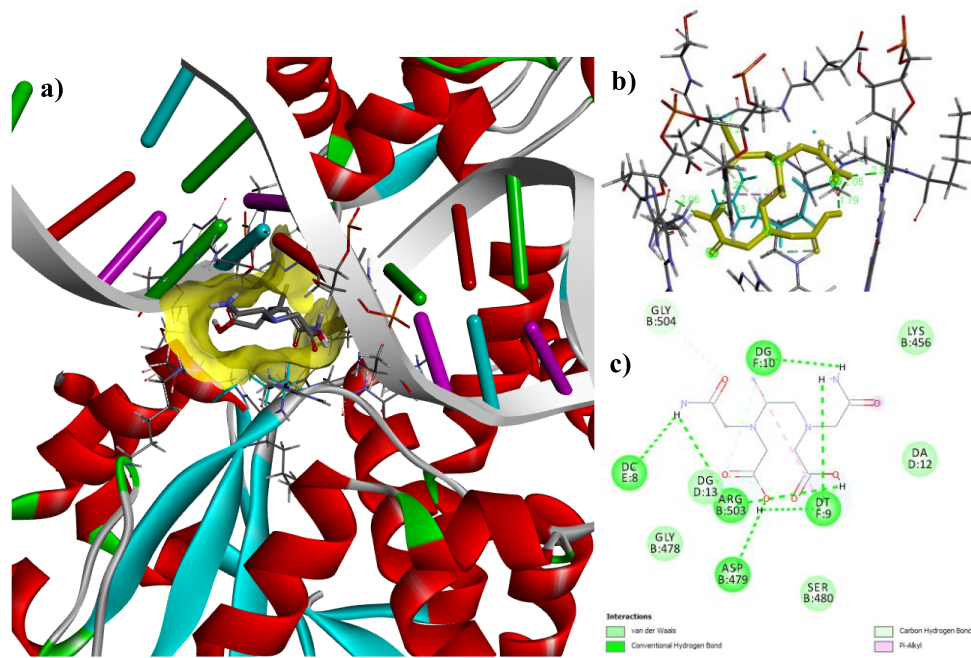


Figure 5. The 3D and 2D docking mode of metabolite ADR-925 with topo II β (PDB ID:3QX3).

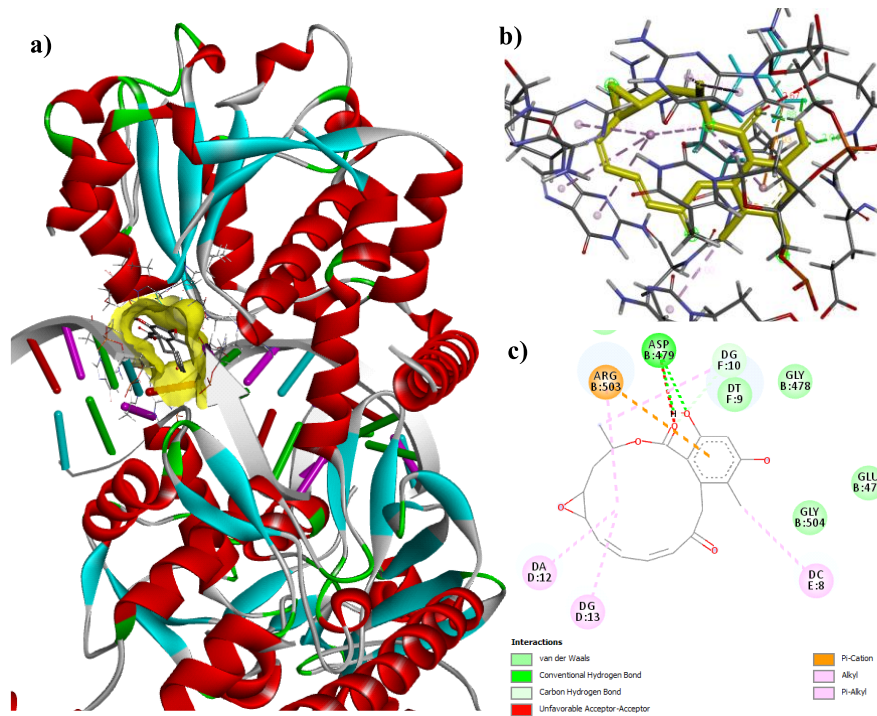


Figure 6. The 3D and 2D docking mode of radicalol with topo II β (PDB ID:3QX3).

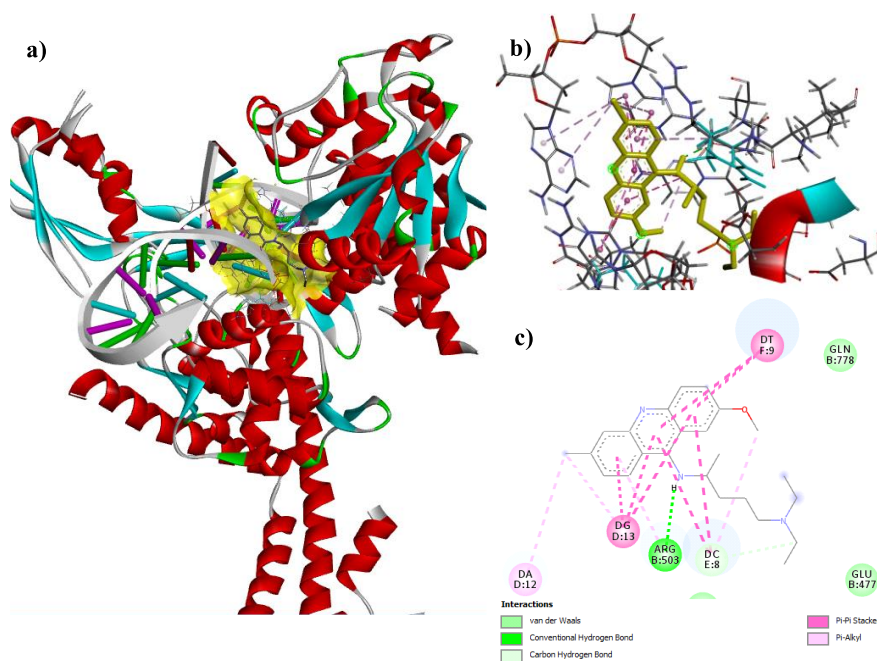


Figure 7. The 3D and 2D docking mode of quinacrine with topo II β (PDB ID:3QX3).

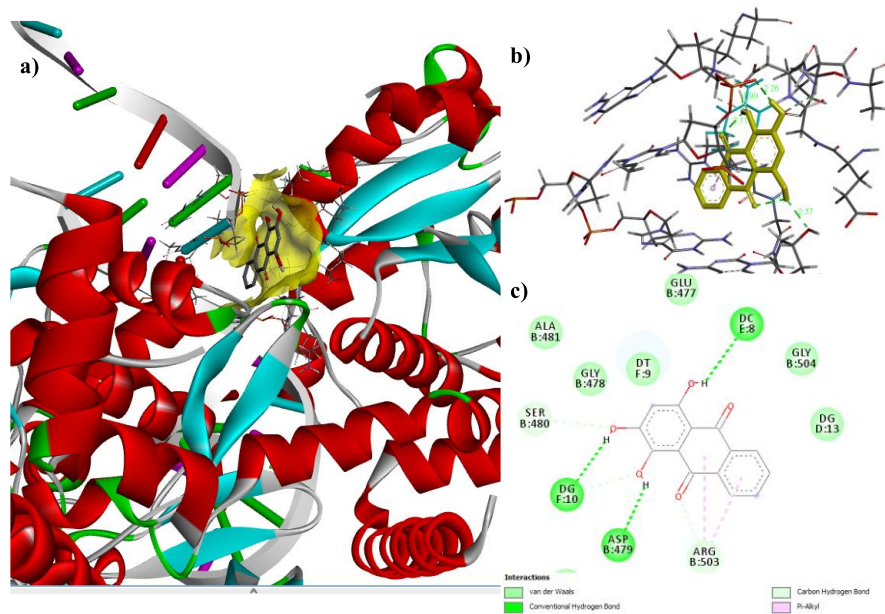


Figure 8. The 3D and 2D docking mode of purpurine with topo II β (PDB ID:3QX3).

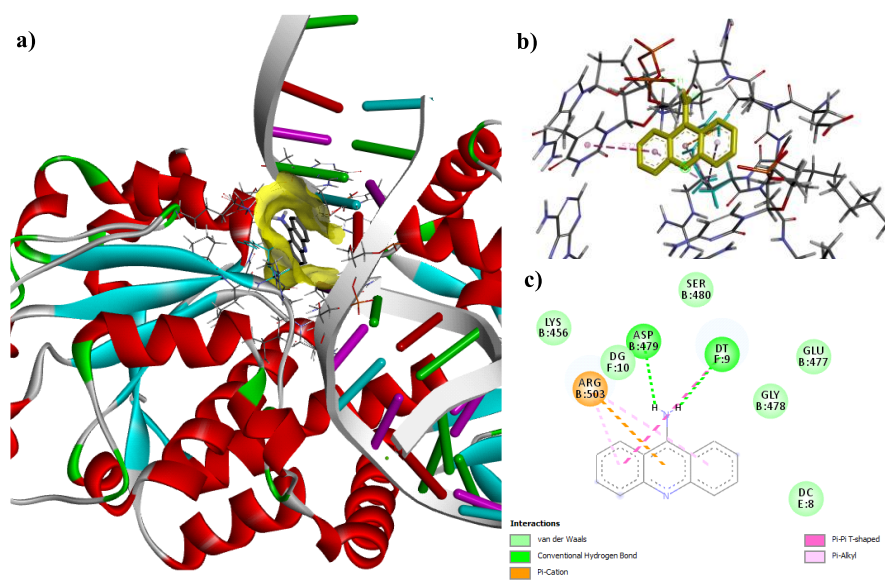


Figure 9. The 3D and 2D docking mode of 9-Aminoacridine with topo II β (PDB ID:3QX3).

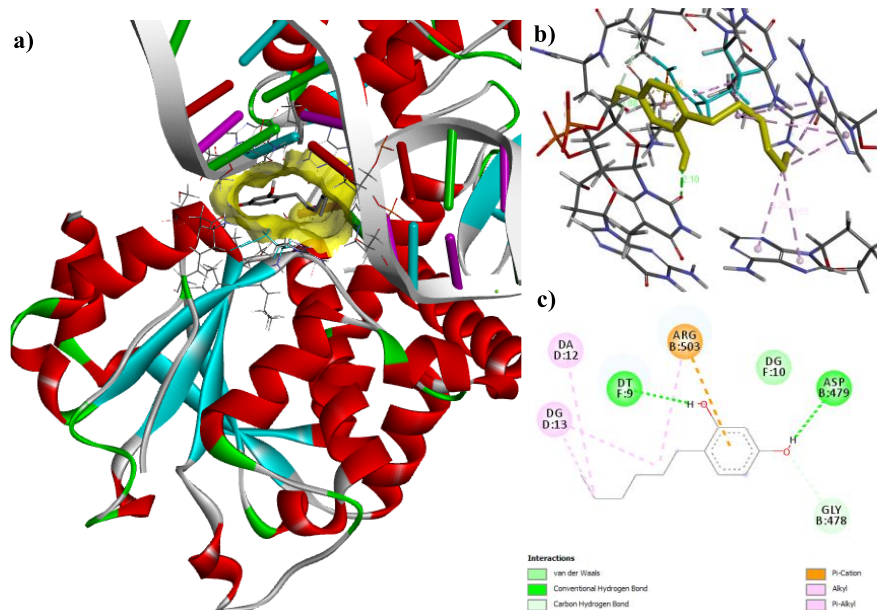


Figure 10. The 3D and 2D docking mode of hexylresorcinol with topo IIβ (PDB ID:3QX3).



MORINGA OLEIFERA’NIN ETKİNLİK VE GÜVENLİĞİ

SAFETY AND EFFICACY OF MORINGA OLEIFERA

Burçin MERSİN^{1*} , Gülçin SALTAN İŞCAN² 

¹ Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 34668, İstanbul, Türkiye

² Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 06560, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: *Moringa oleifera* Lamarck, Orta Doğu, Afrika ve Asya Ülkeleri’nde yetişen bir bitki olup; bu ülkelerde özellikle bitkinin tohumları ve yaprakları gıda olarak tüketilmektedir.

Sonuç ve Tartışma: Bitkinin yaprak ve tohum kısımları fitokimyasallar açısından oldukça zengin olup; flavonoid, glukosinolat, alkaloid, fenolik asit, terpen, sterol, mineral, vitamin, amino asitler ve yağ asitleri taşımaktadır. Tohumlardan elde edilen yağ ise; esansiyel yağ asitleri omega 3, 6 ve 9 açısından çok zengin olması sebebiyle zeytinyağına alternatif bir besin kaynağı olarak görülmektedir. Bitkinin tüm kısımları (yaprak, tohum, kök ve çiçek) insan ve hayvan tüketimine uygun olarak bulunmuştur. Bununla birlikte bitkinin su arıtımı, biyodizel olarak kullanımı, kozmetik sektörü gibi gıda dışı alanlarda da değerlendirildiği bilinmektedir. Bitkinin biyolojik etkileri konusunda uluslararası saygın dergilerde yayımlanmış bilimsel çalışmalar mevcuttur. Yapılan araştırmalar ile bitkinin içerdiği fitokimyasallar sebebiyle antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, antidiyabetik ve kardiyovasküler riskleri önleyici etkileri ispatlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Biyolojik aktivite, Moringa oleifera, Moringa yağı, protein, yağ asitleri*

ABSTRACT

Objective: *Moringa oleifera* Lamarck is a plant grown in Middle East, Africa and Asian countries, where seeds and leaves of the plant are consumed as food in these countries.

Result and Discussion: The leaf and seed parts of the plant are very rich in phytochemicals; high content of flavonoids, glucosinolates, alkaloids, phenolic acids, terpenes, sterols, vitamins, minerals, amino acids and fatty acids. As for the oil obtained from the seeds; It is seen as an alternative food source to olive oil because it is very rich in essential fatty acids omega 3, 6 and 9. All parts of the plant (leaves, seeds, roots and flowers) were found suitable for human and animal consumption. However, it is known that the plant is also used in non-food areas such as water treatment, use as biodiesel, and cosmetics sector. There are scientific studies published in internationally respected journals about the biological effects of plant. The researches revealed that, phytochemicals contained in the plant have proven their antioxidant, antimicrobial, anticancer, antidiabetic and preventive effects on cardiovascular risks.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Burçin Mersin
e-posta / e-mail: burcin.mersin@sbu.edu.tr, Tel. / Phone: +905532046100

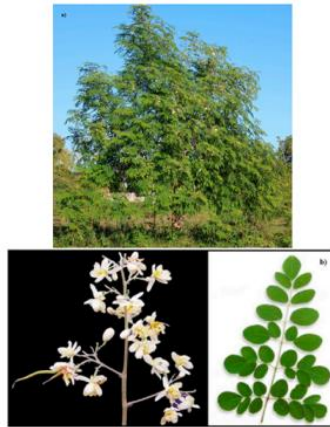
Keywords: *Biological activity, Moringa oleifera, Moringa oil, protein, fatty acids*

GİRİŞ

Bitkiler âleminde Moringaceae familyasına ait 14 adet tür bulunmaktadır. Bu cinsin en iyi bilinen ve kültürü yapılan türü *Moringa oleifera* Lamarck'tır [1]. *Moringa* cinsine ait diğer türler; *Moringa arborea* Verdcourt, *Moringa borziana* Mattei, *Moringa concanensis* Nimmo, *Moringa drouhardii* Jumelle, *Moringa hildebrandtii* Engler, *Moringa longituba* Engler, *Moringa oleifera* Lam., *Moringa ovalifolia* Dinter ex Berger, *Moringa peregrina* Forssk. Ex Fior, *Moringa pygmaea* Verdcourt, *Moringa rivae* Chiovenda, *Moringa ruspoliana* Engler ve *Moringa stenopetala* (Baker f.) Cufodontis olarak belirlenmiştir [2]. Bu türlerden *Moringa zeylanica* Burmann olarak bilinmekte olan tür, *Moringa oleifera* Lam türünün sinonimi olarak kayıtlara geçmiştir [3]. *Moringa oleifera*, *horseradish tree*, *drumstick tree*, *Guiligandja*, *Gagawandalahai* gibi çeşitli isimlerle de tanınmaktadır [4]. Afrika halkı tarafından "mucize ağacı" olarak da adlandırılan bitki, Pakistan'dan Kuzey Hindistan'a kadar uzanan Himalaya Dağlarında doğal olarak yetişmektedir ve farklı iklim koşullarına karşı kolayca uyum sağlamaktadır [5,4].

Botanik Özellikleri

Moringa oleifera (Şekil 1), yaprakları 20-50 cm, yüksekliği 5-12 m'ye varan ağaç şeklinde bir bitkidir [1]. Çiçeklenme durumu yetiştiği ortam koşullarına ve yere bağlı olarak değişiklik göstermekte olup, Kuzey Hindistan gibi mevsimsel olarak serin bölgelerde yıl boyunca yalnızca bir kere çiçek açabilirken Güney Hindistan, Porto Riko ve Karayipler gibi mevsimsel sıcaklık ve yağış rejimlerinin daha sabit olduğu yerlerde yılda iki kere çiçek açar. Meyve uzunlamasına çıkıntılara sahip sarkık, doğrusal, üç taraflı kahverengi kapsül şeklinde, tohumlar ise, koyu kahverengi, küresel ve yaklaşık 1 cm çapında, üç beyazımsı kâğıt gibi kanatlıdır [6].



Şekil 1. *Moringa oleifera* [7]

Kimyasal Bileşim

Yağ asitleri

Moringa oleifera tohumlarının yağ ve protein içeriği açısından oldukça zengin bir kaynak olduğu, bitkinin köklerinin baharat olarak değerlendirildiği bilinmektedir. *M. oleifera* yaprakları ise, karotenoitler, askorbik asit ve demir açısından zengindir [8].

Tohumlardaki yağ asidi bileşiminin yağ elde edilmesi esnasında kullanılan ekstraksiyon yönteminden etkilenmediği tespit edilmiştir. Ancak, yapılan bir çalışmada, çözücü ile ekstre edilmiş yağdaki stearik ve miristik asit içeriğinin soğuk sıkım elde edilen yağa kıyasla küçük bir artış gösterdiği bildirilmiştir [9].

M. oleifera tohumları % 36,7 oranında yağ, % 31,4 protein, içeriğine sahipken, % 18,4 karbonhidrat, % 7,3 lif taşımaktadır. Yağı alınan *M. oleifera* tohumlarının protein kaynağı olarak takviye gıdalara ilavesi önerilmektedir. Bitkinin tohumlarının metiyonin ve sistein içeriği açısından da süt ve yumurtaya eşit olduğu bildirilmiştir. Etanollü tohum ekstresinin benzil karbamat, benzil izotiyosiyanat, niazimisin, sitosterol ve niazirin gibi bazı biyoaktif bileşikler de taşımakta olduğu tespit edilmiştir [10].

Tohumlarda yüksek miktarda bulunan behenik asit, yağın ticari olarak "Ben" veya "Behen" yağı olarak bilinmesinin nedenidir. Oleik asit, linoleik asit, tokoferoller, palmitoleik asit, miristik asit, araşidik asit, stearik asit, linoleik asit tohumların taşıdığı diğer yağ asitleri olup, kerotik, lignoserik, miristik, margarik ve kaprilik asitleri de tohumlarda daha az miktarda bulunan yağ asitleridir [9].

Moringa oleifera tohum yağında en çok bulunan yağ asidi ise oleik asit olarak belirlenmiştir [11]. Oleik asit stabilitesinin oldukça yüksek olması ve yüksek besin değeri açısından oldukça önem arz etmektedir. Doymamış yağ asitleri miktarının % 76 civarında bulunması sebebiyle *M. oleifera* yağı besin olarak tüketime uygun bir yağ olarak nitelendirilmektedir [12].

M. oleifera tohumları vitamin açısından da zengin olup, tohumların % 2,04 oranında provitamin A, % 0,94 tiamin içerdiği tespit edilmiştir. *M. oleifera* tohum yağında α -tokoferol, γ -tokoferol ve δ -tokoferol formunda E vitamini de bulunmaktadır. Bitkinin tohumları ayrıca potasyum, fosfor, sodyum, çinko, magnezyum ve kalsiyum gibi mineraller açısından da zengindir [2,13]. *M. oleifera* tohumu yağının, alfa, gama ve delta tokoferollerden oluşan yüksek tokoferol içeriği ile karakterize edildiği bildirilmiştir [14].

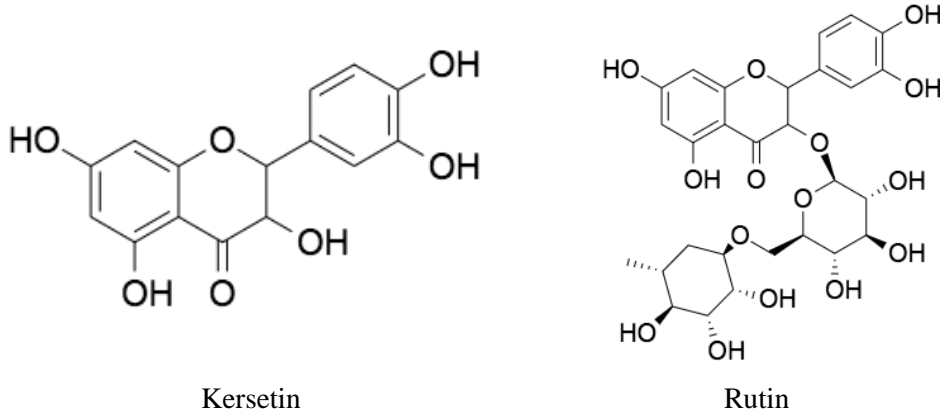
Alkaloitler, tanenler, steroidler, fenolik asitler, glukosinolatlar, saponinler ve terpenler *Moringa* türlerinde bulunan diğer metabolitlerdir [2].

Flavonoitler

M. oleifera tohumları fenolik bileşikler açısından da zengindir. En sık rastlanan fenolik bileşikler; kateşin, epikateşin, kersetin ve kemferol'dür. Tohumlar, gallik asit, elajik asit ve kafeik asitlerin yanı

sıra alkaloidler, glukosinolatlar, izotiyosiyanatlar ve tiyokarbamatlar gibi önemli biyoaktif bileşikler de içermektedir [9].

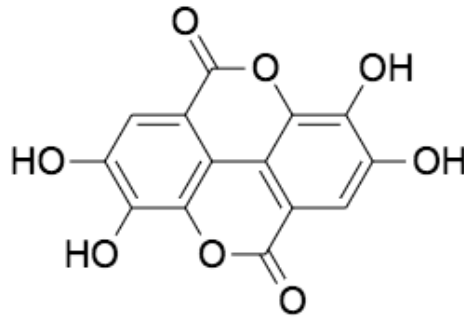
Flavonoidler genelde serbest flavanol ve glikozitleri formunda bulunmaktadır. *M. oleifera*'nın esas olarak yüksek miktarda flavonoid içeriği nedeniyle güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır [2]. Yapraklar genellikle yüksek oranda flavonoid taşırken, tohumlarda protein miktarının daha fazla olduğu belirlenmiştir [15]. Bitkide en yaygın bulunan flavonoidlerin (Şekil 2); rutin, kersetin, ramnetin, kemferol, apigenin ve mirsetin olduğu tespit edilmiştir [2].



Şekil 2. Kersetin ve rutin

Fenolik Asitler

Moringa oleifera yaprakları, majör fenolik asit bileşeni olarak gallik asit içermektedir. Ayrıca, elajik asit (Şekil 3), salisilik asit, ferulik asit, kafeik asit, klorojenik asit, neoklorojenik asit, *o*- ve *p*-kumarik asit gibi kimyasal bileşikler de taşımakta olduğu tespit edilmiştir. *M. oleifera* tohumlarında *p*-kumarik, vanilik, protokateşik, ferulik ve sinnamik asitler gibi fenolik asitler de tanımlanmıştır, ancak bu bileşiklerin yapraklara göre daha az miktarda olduğu saptanmıştır [16].

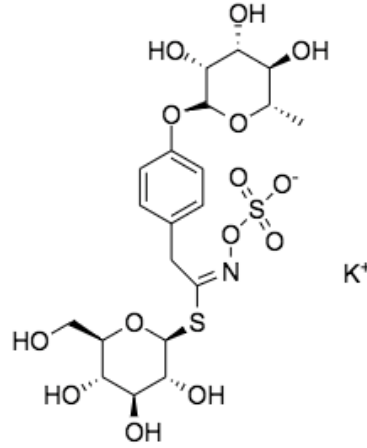


Şekil 3. Elajik asit

Glukosinolatlar

Moringa türlerinin bol miktarda glukosinolat içerdiği tespit edilmiştir. Glukosinolatlar içerisinde en çok bulunan 4-O-(α L-ramnopiranoziloksi)-benzil glukosinolat olarak bilinen glukomoringin (GMG)

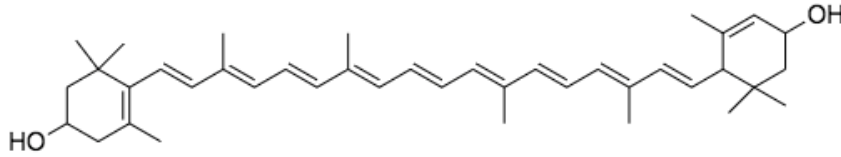
(Şekil 4) olarak saptanmıştır. *M. oleifera*'nın tohum ve yapraklarının, bitkinin diğer kısımlarına kıyasla daha yüksek miktarlarda glukosinolat içeriğine sahip olduğu bulunmuştur. Glukosinolatların, *M. oleifera* bitkisinin kökleri hariç çoğu organında yüksek oranda bulunduğu bilinmektedir. *M. oleifera* sinalbin, glukotropaeolin, benzil izotiyosiyanat gibi yüksek miktarda aromatik glukosinolat içeriğine sahip olduğu bulunmuştur. Glukosinolatların tohumlarda diğer bitki kısımlarına kıyasla % 8 daha yüksek olduğu bildirilmiştir [15].



Şekil 4. Glukomoringin

Terpenler

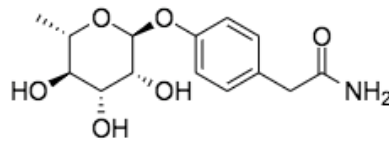
Moringa oleifera yapraklarında terpen yapısında lutein (Şekil 5), β - karoten, β - amirin ve α - amirin tespit edilmiştir [17].



Şekil 5. Lutein

Alkaloitler

Moringa oleifera yapraklarından iki yeni pirol alkaloit glikozitleri olan marumosid A (Şekil 6) ve marumosid B izole edilmiştir [2].



Şekil 6. Marumosid A

Steroller

M. oleifera tohumlarından soğuk sıkım ve Soxhlet apareyi ile elde edilmiş yağın sterol bileşenleri analiz edildiğinde kampesterol, stigmasterol, β -sitosterol ve δ 5-avenasterol en baskın bileşenler olarak tespit edilmiştir. Genellikle soğuk sıkım tekniği ile elde edilen *M. oleifera* tohum yağının sterol içerikleri Soxhlet apareyi ile elde edilmiş yağın sterol içeriğinden daha zengin bulunmuştur [18].

Bitkinin yağının, tohumlarının ve yapraklarının β -sitosterol içerdiği tespit edilmiştir. Stigmasterol ve kamfesterol daha çok yağda bulunurken lupeol yapraklarda daha fazla olarak bulunmaktadır [2].

Biyolojik Etkileri

Moringa türleri üzerinde yapılan *in vitro* deneysel çalışmalarda yaprak ve tohumların antienflamatuvar, yara iyileştirici, antitümör, antidiyabetik, antioksidan ve cinsel fonksiyonların düzenlenmesi gibi çeşitli biyolojik etkiler gösterdiği tespit edilmiştir [19].

M. oleifera yapraklarının antioksidan etkinliği β -karoten, C vitamini, E vitamini ve polifenoller açısından zengin olmasına bağlıdır. *M. oleifera*'nın antienflamatuvar, antikanser, hepatoprotektif ve nöroprotektif etkinliklerine yapılan çalışmalar özellikle son yıllarda artış göstermiş olup, biyolojik etkinliğe ait etki mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmaktadır [20].

Bitkinin flavonoidler ve glikozitler açısından zengin olması sebebiyle antioksidan, antienflamatuvar, antimikrobiyal, antikanser ve antihipertansif aktivitelere sahip olduğu da belirtilmektedir [10].

Antimikrobiyal Etki

Moringa oleifera kök kabuğunun etanol ekstresinin kloroform fraksiyonundan izole edilen deoksi-niazimisinin aglikonunun antibakteriyel ve antifungal aktivitelere sorumlu olduğu görülürken, gövde kabuğundan gelen öz suyun *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel bir etki gösterdiği saptanmıştır. *M. oleifera*'nın yapraklarından elde edilen sulu ve etanollü ekstreler, Gram-negatif türler (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus* ve *Aeromonas caviae*) zerinde Gram-pozitif türler (*Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis*) zerinde güçlü inhibitör etkileri olan umut verici antibakteriyel özelliklere sahip bileşikler olarak nitelendirilmiştir [21].

Tohum ekstresinin çok sayıda bakteri ve mantar türüne karşı iyi bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Tohumların antimikrobiyal aktivitesi de kısa bir katyonik proteinin varlığı ile ilişkilendirilmektedir. *M. oleifera* katyonik proteini olarak bilinen bu proteinin, hızlı topaklanma ve hücre i ve dış zarlarının füzyonu yoluyla bakteriyel hücre hasarına neden olduğu tespit edilmiştir. Antimikrobiyal aktivitesi nedeniyle *M. oleifera* tohumlarının, gelişmekte olan ülkelerde su arıtma

problemi için doğa bazlı çözüm olarak kullanıldığı bilinmektedir. Konu ile ilgili yapılan çalışmalar, bu basit filtreleme yönteminin sadece su kirliliğini değil, zararlı bakterileri de azalttığını göstermiştir [9].

Başka bir çalışmada ise, bitkinin yaprak, kök, kabuk ve çiçeklerinden hazırlanan metanol, etanol ve etil asetat ekstralarının antibakteriyel aktivitesi, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Erwinia carotovora*'ya karşı disk difüzyon ve minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) yöntemleriyle test edilmiş ve yaprak ekstralarının, *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı *Erwinia carotovora*'a kıyasla daha geniş bir inhibisyon alanı gösterdiği tespit edilmiştir. MIC yönteminde ise; kök etil asetat ekstresinde *P. aeruginosa* için % 86 ± 1 , yaprak etanolü ekstresinde ise; *E. Carotovora* için % 79 ± 0.3 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, *M. oleifera*'nın antibakteriyel aktivitesinin, bazı antibiyotiklerin yerini alabilecek potansiyel bir antibakteriyel ilacın kaynağı olabileceği şeklinde yorumlanmıştır [22].

Antiviral Etki

M. oleifera tohumlarından izole edilen Moringa A'nın İnfluenza A virüslerine karşı virüsidal aktivitesine yönelik olarak yapılan bir çalışmada ise; bu bileşiğin konak hücrelerde virüs replikasyonunu inhibe ettiği ve enfekte olmuş hücreleri İnfluenza A virüslerinin neden olduğu sitopatik etkiden koruduğu tespit edilmiştir. Bu bileşiğin ayrıca H1N1 (Pandemik İnfluenza A) ile enfekte olmuş RAW264.7 hücrelerinde enflamatuvar sitokinler olan TNF- α (Tümör Nekroz Faktör Alfa), IL-6 (İnterlökin-6), IL-1 β (İnterlökin-1 Beta) ve IFN- β (İnterferon Beta-1a)'yı azalttığı da gözlenip, Moringa A'nın önemli bir antiviral mekanizmaya sahip olabileceği şeklinde değerlendirme yapılmıştır [23].

Kardiyovasküler Etki

M. oleifera bitkisinin her kısmının kardiyovasküler sistem üzerinde etkili olduğu, dolaşım uyarıcısı olarak kullanılabileceği, kolesterolü ve kan basıncı seviyesini düşürücü özellik sergilediği yapılan deneysel çalışmalarla gösterilmiştir. Yaprak ekstresinin hipokolesterolemik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Tohum ve yaprak ekstralarının içerdikleri alkaloidler ve flavonoidler ile anjiyotensin dönüştürücü enzimler üzerinde inhibitör etki mekanizmasıyla yüksek tansiyonu düşürücü özellik gösterdiği bildirilmiştir [24].

M. oleifera yaprak ekstresinin kardiyovasküler hastalıklar için kullanılan selektif bir β 1-reseptör antagonisti olan atenolol ile karşılaştırıldığı bir çalışmada, *M. oleifera*'nın yaprak ekstresinin deney hayvanlarında hipolipidemik, serum trigliserit ve kolesterol seviyelerini düşürücü etkiler gösterdiği bulunmuştur [25].

M. oleifera tohumlarının toz haline getirilip miyokard infarktüs hastalığına yakalanmış farelere oral uygulama ile verildiği bir çalışmanın sonuçları kardiyak fonksiyonlar üzerinde anti-apoptoz ve antioksidan etki gösterildiği bildirilmiştir. Bu etki ise bitkide antioksidan bileşiklerin sinerjik etki göstermesi ile bağdaştırılmıştır. Sonuç olarak *M. oleifera* tohumlarının miyokard infarktüsüne bağlı

hasarları düzenlemesi ve diğer kardiyovasküler bozuklukları sınırlamak için terapötik bir umut verebileceği bildirilmiştir [26].

Antidiyabetik Etki

M. oleifera'nın diyabete karşı terapötik bir ajan olarak kullanımı konusunda çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Çalışmalarda tip 2 diyabetli sıçanlarda *M. oleifera* yapraklarının glikoz konsantrasyonunu önemli ölçüde düşürdüğü gösterilmiştir. Yapraklarda bulunan polifenolik maddeler hipoglisemik aktiviteden sorumlu olan güçlü bileşikler olarak gösterilmiştir. *M. oleifera* ayrıca kersetin-3-glukozit ve yaprak tozunda bulunan liflerin aracılığıyla glikoz intoleransı üzerinde olumlu bir etkiye sahip olarak gösterilmektedir [25].

M. oleifera'nın hipoglisemik aktivitesinin, bitkinin farklı kısımlarında bulunan flavonoidlerin, kersetin ve kemferol gibi antioksidan bileşiklerin, polifenolik yapıların ve vitaminlerin varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kersetinin, insülin gibi glukokinazın da hepatik aktivitelerini önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir. Bitkinin yapraklarının, β -hücrelerinin uyarılmasında ve daha sonra önceden oluşturulmuş insülin salgılanmasında rol oynayan terpenoidleri içerdiği de bildirilmiştir. *Moringa oleifera* yapraklarında bulunan izotiyosiyanatlar gibi diğer bileşiklerin insülin direncini ve hepatik glukoneogenezi azalttığı deneysel çalışmalarla gösterilmiştir [27].

M. oleifera tohumlarının metanol ile hazırlanmış ekstralarının, hücrel antioksidan savunma mekanizmalarını güçlendirerek ve streptozotisin (STZ) ile indüklenen diyabette hiperglisemiyi en aza indirerek β -hücrelerini reaktif oksijen türlerinden kaynaklanan hasara karşı koruduğu da yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Yazarlar tarafından bu çalışmanın, bu bitkiden güçlü bir antidiyabetik ilaç geliştirmek için heyecan verici bir fırsat olduğu yönünde değerlendirme yapılmıştır [28].

Bir başka çalışmada ise; *Moringa* yapraklarının sulu ekstresinin hipoglisemik ve antidiyabetik etkileri, normal ve STZ ile indüklenen hafif ve şiddetli diyabetik albino sıçanlarda araştırılmıştır. *Moringa* yaprağı ekstresinin oral yoldan verilmesinin, açlık kan şekeri seviyesinde maksimum % 26,7'lik bir azalmaya ve 3 saatlik glikoz tüketiminden sonra glikoz toleransında maksimum % 30'luk bir azalmaya aracılık ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca, ileri derecede diyabetik sıçanların 21 gün boyunca aynı dozda *Moringa* yaprağı ekstresi ile tedavi edilmesi, açlık kan şekeri ve tokluk kan glikoz seviyelerinde sırasıyla maksimum % 69,2 ve % 51,2'lik bir azalma görülmesi ile sonuçlanmıştır. İlgi çekici bir şekilde, *Moringa* yaprağı ekstresi ile tedavi edilen sıçanlar üzerinde gözlemlenen kan şekeri düşürücü etkilerin, bir referans ilaç olan Glipizid'in, 2,5 mg/kg vücut ağırlığı uygulama dozu ile tedavi edilen sıçanlar üzerinde gözlemlenen etkilere benzediği ortaya çıkarılmıştır [29].

M. oleifera'nın terapötik kullanımına ilişkin çalışmaların çoğu bitkinin yapraklarından hazırlanan sulu veya alkollü ekstraların, hiperlipidemi ve hiperglisemi üzerindeki etkilerinin araştırılması hakkında

yapılmıştır. Bu konuda bitkinin yapraklarının toz haline getirilmiş formu ile ilgili kullanımına ilişkin çalışmalar sınırlıdır. *M. oleifera* ekstresinin oral yoldan uygulanmasının, alloxan ile indüklenen diyabetik sıçanlarda kan şekeri konsantrasyonunu önemli ölçüde azalttığı ve kilo kaybını engellediği Olayaki ve arkadaşları tarafından 2015 yılında yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [30].

Deney hayvanları ile yapılan bir çalışmada ise; bitkinin yaprakları, tohumları ve meyveleri ve bitki ekstrelerinin (toz, sulu, metanollü veya etanollü) tüm diyabetli hayvan modellerinde hiperglisemide önemli bir azalma gösterdiği bildirilmiştir. *M. oleifera* ekstrelerinin diyabetik hayvan modelleri üzerindeki akut antihiperglisemik etkilerine dair kanıtlar sağlam gözükmemektedir, ancak daha fazla kronik ve uzun vadeli çalışmalara ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir [31].

Klinik çalışmalarla ilgili olarak ise; yapılan çalışmalarda tip 2 diyabetli hastalarda *M. oleifera*'nın etkinliğine ilişkin kanıtlar tutarsız olarak değerlendirilmiştir. FDA tarafından diyabet ilaçlarının geliştirilmesiyle ilgili olan kılavuza göre, diyabete yanıt veren ajanların çoğu tarafından 20 mg/dL'den fazla bir açlık kan şekeri azalmasının sağlandığı ve 6 haftada % 0,3'lük mutlak bir HbA1c azalmasının klinik olarak anlamlı kabul edildiği belirtilmektedir. Mevcut ön veriler, *M. oleifera* kullanımının tip 2 diyabetli hastalarda glisemik kontrolü iyileştirebileceğini göstermektedir, ancak elde edilen kanıtların düzeyi yeterli değildir. Bu nedenle, kullanımının tavsiye edilebilmesi için, standardize edilmiş preparatların kullanıldığı iyi tasarlanmış çalışmalardan olumlu sonuçlara ihtiyaç vardır [32].

Antikanser Etki

M. oleifera yapraklarının sulu ekstrelerinin polifenoller içerdiği ve DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürücü aktiviteye sahip olduğu Charoensin ve Wongpoomchai tarafından yapılan çalışmalarla bildirilmiştir. Ayrıca *M. oleifera* yapraklarının polifenoller ve flavonoidler açısından zengin olduğunu ve bu nedenle antioksidan aktiviteye sahip olduğunu gösteren eden bazı raporlar bulunmaktadır. Daha önceki çalışmalara göre metanol ve diklorometan ile hazırlanan *M. oleifera* yaprak ekstrelerinin de antioksidan aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Metanol ile ekstre edilen *M. oleifera*'nın kimyasal analizine göre, polifenolik bileşiklerin gallik asit, kersetin ve kemferolden oluştuğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [33].

Bitkinin antikanser aktivitesi ile ilişkilendirilen yaprak kısmının aktif bileşikleri glukozinolatlar, niazimisin ve benzil izotiyosiyanat olarak değerlendirilmiştir. Moringa yapraklarından elde edilen biyoaktif bir bileşik olan niazimisinin, potansiyel antikanser aktivite gösterdiği yapılan bir çalışmada ortaya konmuştur. Benzil izotiyosiyanatın kanser hücreleri ile etkileşime girebildiği gösterilmiştir. Araştırmalar, benzil izotiyosiyanatın hücre ölümüne yol açan hücre içi reaktif oksijen türlerine neden olduğunu göstermiştir. Bu bulgu da, *M. oleifera* 'nın iyi bir antikanser ajan olabileceğinin nedenlerinden biri olarak değerlendirilmiştir. *M. oleifera*, antitümör aktiviteleri olan, prostat ve cilt kanserlerine karşı etkili ve güçlü bir antioksidan olan doğal olarak oluşan bir sitokin olan Zeatin adlı bir yaşlanma karşıtı

bileşik içermektedir. *M. oleifera* yapraklarının ayrıca insan miyelom hücre dizileri üzerinde önemli bir sitotoksik etki gösterdiği de tespit edilmiştir [34].

Bir başka çalışmada ise; *M. oleifera* yaprak ekstralarının, potansiyel antikanser bileşiklerinin üçlü negatif meme kanseri MDA-MB-231 hücre hattına karşı etkileri incelenmiştir. Çalışmada özellikle, 7-oktenoik asit, oleamid ve 1-fenil-2-pentanol dahil olmak üzere tanımlanan üç bileşiğin üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarına karşı bireysel etki mekanizmalarını da araştırılmıştır. Bulgulara göre, oleamidin, Bcl-2 ekspresyonunu baskılayarak apoptozu indükleyerek ve ardından kaspaz 3 aktivasyonunu teşvik ederek bir antikanser ajan olarak en güçlü potansiyele sahip olduğu ortaya konulmuştur. Yapılan bu çalışma, MDA-MB-231 hücre hattına karşı *M. oleifera* yaprak ekstresi ve oleamid aktivitesi ile ilgili ilk rapor olarak bildirilmiştir [35].

M. oleifera'dan alınan bir glukosinolat olan GMG'in, önemli bir sekonder metabolit bileşiği olarak değerlendirilmektedir. Bitkinin tohumlarının ve yapraklarının en yüksek miktarda glukosinolat içerdiği bildirilmektedir. Antikanser aktivite çalışmalarında apoptozu indükleme yeteneğine sahip olduğu bildirilen glukosinolatın varlığı nedeniyle *M. oleifera*'nın kemopreventif etkilerinin olması beklenmektedir. Aslında, GMG'in hidroliz ürünü, 4 (alfa-L-ramnosil oksi) benzil izotiyosiyanatın (GMG-ITC) olarak adlandırıldığı ve apoptozu indüklemede hidroliz olmayan GMG'den daha başarılı olduğu bildirilmiştir [34].

HeLa hücreleri, *M. oleifera* yapraklarının sulu ekstresi ile muamele edildiğinde, konsantrasyona bağlı bir sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir. Konsantrasyon 10'dan 100 µg / ml'ye yükseldikçe, inhibisyon yüzdesinin % 8'den % 60'a yükseldiği gözlemlenmiştir. 100 µg / ml'lik bir konsantrasyonda, hücre canlılığında ciddi bir düşüş (% 39,5) varlığı tespit edilmiştir. Grafikten yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonu IC₅₀ değeri 70 µg / ml olarak bulunmuştur. Ancak metanol ve hekzan ekstraları söz konusu olduğunda, konsantrasyon arttıkça hücre canlılığı yüzdesi de arttığı bildirilmiştir [37].

M. oleifera tohumlarının yaşlanma ve kanserle ilişkili oksidatif hasarı azaltabilen iyi bir antioksidan olduğu keşfedilmiştir. *M. oleifera* tohumlarından izole edilen biyoaktif bileşiklerin çoğunun potansiyel antitümör promotörleri olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, son çalışma sonuçları *M. oleifera* tohumlarının etanol ekstraktının meme ve kolorektal tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmede anlamlı bir etkisi olmadığını bulmuştur. Bununla birlikte, yakın tarihli bir çalışmada, *M. oleifera* yağının çeşitli kanser hücre dizilerinde sitotoksik bir etkisi gözlenmiştir [38].

M. oleifera'nın kanser tedavisine olumlu katkıları olduğunu gösteren çalışmaları doğrulamak için insanlar üzerinde ek klinik testler yapmak gereklidir ve bu koşullara sahip hastalara uygulanan ilaçlarla bitkinin etkileşimlerini değerlendirmek de aynı derecede önemlidir [39].

Antiartritik Etki

Moringa oleifera'nın antienflamatuvar aktivitesinin değerlendirilmesi için, *in vitro* testler, albümin denatürasyonunun inhibisyonu, membran lizileri ve proteinaz deneyleri gibi çalışmalar yapılmıştır. Artritte doku proteinlerinin denatürasyonu meydana gelmektedir. Bu denatürasyonun, otoantijen üretimine bağlı olduğu düşünülmektedir. Bitkinin metanollü, sulu ve etil asetatlı ekstralarının albümin denatürasyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Bitkiden elde edilen ekstraların, protein denatürasyonuna karşı koruyucu etkisi, artritte önemli antienflamatuvar etki gösteren nonsteroidal antienflamatuvar ilaçların etkisine benzediği tespit edilmiştir. *M. oleifera*'nın antiartritik aktivitesi, bu ekstraların serbest radikallerin temizlenmesi, protein denatürasyonunun inhibisyonu, membran stabilizasyonu ve anti-tripsin aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, bitki ekstralarında flavonoidler ve fenolik maddelerin, akut antioksidan ve antiartrit aktivitesinden sorumlu olduğu ileri sürülmektedir [40].

Metotreksat, Fluoksetin ve *Moringa oleifera*'nın, sıçanlarda görülen romatoid artrit modeli üzerindeki olası etkisini değerlendirmek için tasarlanan bir çalışmanın sonucunda, Metotreksat, Fluoksetin ve *Moringa oleifera* adjuvan artriti iyileştirdiği ortaya konmuştur. *Moringa oleifera* ekstresinin, romatoid artrit vakalarında yeni bir tedavi yaklaşımı olarak kullanılabilmesi, böylece yan etkilerinden kaçınmak için Metotreksat dozunun azaltılabileceği öne sürülmüştür [41].

Yapılan bir *in vitro* çalışmada; *Cardiospermum halicacabum* ve *Moringa oleifera* ekstralarının karışımının, insan eritrositlerinin membran stabilizasyonu yöntemiyle çok güçlü bir antienflamatuvar özelliğe sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, yumurta albümini denatürasyon yöntemi üzerinde bitkinin antiartrit aktivitesinin gösterildiği bir *in vitro* çalışma da ortaya konmuştur. Bu sonuçlar, *Cardiospermum halicacabum* ve *Moringa oleifera* karışımının, antienflamatuvar ve antiartritik bir ajan olarak güçlü bir aday olabileceğini düşündürmektedir [42].

Başka bir araştırmada, *M. oleifera*'nın, sıçanlar üzerinde terebentin yağı ile indüklenen pençe ödemi sonucu oluşan akut ve kronik enflamasyonda, formaldehit ile indüklenen pençe ödeminde ve Komplet Freund Adjuvanı (CFA) ile indüklenen artriti hafifletmede etkili olduğu ortaya konmuştur. Sonuç olarak, bitkinin insanlarda akut ve kronik artrit durumları için potansiyel bir tedavi olarak araştırılması önerilmektedir [43].

Toksisite çalışmaları

Yenilebilir bir bitki olan *Moringa oleifera*, toksisite açısından düşük seviyede toksik olarak değerlendirilmiştir. Wistar sıçanlara 6400 mg/kg dozda oral olarak verilen *M. oleifera* yapraklarının sulu ekstresinin herhangi bir ölüme neden olmadığı rapor edilmiştir. Ancak daha yüksek dozlarda uygulama yapıldığında (3200 ve 6400 mg / kg), sıçanların hareketliliğinde azalmalar ve donuk davranış biçimleri gözlemlendiği de bildirilmiştir. Bitkinin yaprakların LD₅₀ değeri ise; 1585 mg/kg olarak bildirilmiştir.

Sonuç olarak, yaygın olarak kullanılan *M. oleifera* konsantrasyonlarının çok az yan etkiye neden olduğu, tıbbi ve beslenme uygulamalarında güvenli kabul edildiği bildirilmiştir [44].

Doğal veya sentetik kaynaklı herhangi bir maddenin uzun süreli veya aşırı alımı, organlar ve metabolik yollar üzerinde istenmeyen etkilere neden olabilir. Moringa tkretiminin insan çalışmalarında bilinen bir toksik etkisi olmamasına rağmen, besin olarak alınımında sınırlama getirilmediği takdirde toksisite görülebileceği riski göz ardı edilmemelidir. Günlük olarak 70 g/gün dozda *Moringa oleifera* yaprağı alınmasının aşılmadığı durumlar güvenli olarak kabul edilmektedir [45].

M. oleifera kullanan 57 yaşında, hipertansiyon, dislipidemi ve fibromiyalji öyküsü olan kadın hastada bitkinin kullanımına bağlı deri toksisitesi ile ilgili kayıtlara geçmiş bir vaka bulunmaktadır. Bu vakada hasta, 3 gün önce ortaya çıkan ve hafif solunum sıkıntısı ve dilde demin eşlik ettiği yaygın kaşıntılı döküntü nedeniyle acil servise sevk edilmiştir. Hasta rutin alışkanlıklarına ek olarak son 2 haftadır kilo vermek amacıyla Moringa tozu aldığını, salatalara ölçsüz miktarda toz şeklinde eklediğini belirtmiştir. *M. oleifera*'ya bağlı kutanöz toksisitenin şüphelenilen teşhisine dayanarak, Moringa tozunun kullanımını durdurulmuş ve hastaya antihistaminik ilaçlar ile topikal kortikosteroid içeren semptomatik tedavi uygulanmış, takiben sonraki 10 gün içinde sorun aşamalı olarak zlerek hasta normale dönmüştür. *M. oleifera*'nın, herhangi bir tıbbi bitki gibi, bazı bileşenlerinin doğrudan farmakolojik etki göstermesi ve yaygın olarak kullanılan ilaçlarla etkileşime girmesi gibi sebeplerle toksik etki oluşturma potansiyelinin var olduğu göz önünde bulundurulması tavsiye edilmektedir [46].

Sıçanlarda yapılan 14 günlük kısa süreli bir oral toksisite çalışmasında ise; bitkiden izole edilen moringa izotiyosiyanat-1 (MIC-1) ile zenginleştirilmiş moringa tohumlarının sulu-alkollü ekstrelerinin güvenliliği değerlendirilmiştir. Çalışma, her grupta 5 erkek ve 5 dişi sıçan olacak şekilde 5 gruba bölünerek toplam 50 sıçan ile yürütülmüştür. Gavaj yolu ile yapılan uygulamada Moringa tohum ekstrelerinin miktarları, moringa izotiyosiyanat-1 (MIC-1) zerinden standardize edilmiştir. Çalışmada 1. grup kontrol grubu olarak kullanılmış ve sıçanlara sadece distile su verilmiştir. Diğer gruplara ise sırasıyla 78, 257, 772 veya 2571 mg/kg/gün dozlarında Moringa tohum ekstresi gavaj şeklinde uygulanmıştır. Uygulanan tohum ekstrelerinin moringa izotiyosiyanat-1 (MIC-1) içerikleri ise sırasıyla 0, 30, 100, 300 ve 1000 mg/kg/gün olarak standardize edilmiştir. Mortalite; çalışmanın bitiminden önce 5 erkek ve 3 dişinin hepsinin ldğu 2571 mg/kg/gün şeklindeki yüksek doz alan grupta (5. grup) gözlenmiştir. Hematolojik değişiklikler de sadece yüksek doz tedavi gören 5. grup hayvanları üzerinde görülmüştür. Bu grupta ayrıca, hayatta kalan dişi hayvanlar üzerinde artan nötrofil ve akyuvar sayıları ile birlikte, lenfosit sayılarında bir azalma tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak; Moringa 100 mg/kg/gün MIC-1 üzerinden standardize edilmiş, tohum ekstresinin NOAEL değeri (Deney Hayvanlarında gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen dozu) yaklaşık olarak 257 mg/kg/gün olarak tespit edilmiştir [47].

Sağlıklı yetişkin dişi ve erkek Wistar sıçanları üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise; sıçanlara 2000 mg/kg dozunda tek doz oral *M. oleifera*'nın metanollü ekstresi uygulanmıştır. Uygulama sonunda hayvanlarda mortalite, davranışsal ve psikolojik değişimler gözlemlenmezken, hematolojik açıdan kayda değer olmayan değişimler tespit edilmiştir [48].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu derlemede; özellikle Hindistan'da gıda olarak tüketilen, dünya üzerinde popülerliği gün geçtikçe artan *Moringa oleifera* biktisinin botanik özellikleri, elde ediliş ve kullanım alanları, kimyasal bileşimi, biyolojik etkileri, toksik etkileri, yan etki ve uyarıları açısından bilimsel verilere dayandırılarak incelenmiştir.

Moringa oleifera, tropik iklimlerde yaşayan insanların doğal beslenmesi için büyük ilgi gören önemli bir gıda ürünü olarak tanınmaktadır. Bu ağacın yapraklarının, meyvelerinin, çiçekleri ve olgunlaşmamış kabuklarının pek çok ülkede, özellikle Hindistan, Pakistan, Filipinler, Hawaii ve Afrika'nın birçok yerinde oldukça gıda kaynağı olarak kullanıldığı bilinmektedir [49].

Bildirilen çalışmaların çoğu, *Moringa oleifera* yapraklarının, besin olarak tüketilen diğer yapraklara kıyasla, protein açısından son derece yüksek olduğunu göstermiştir. Taze *Moringa oleifera* yaprakları trans-lutein (yaklaşık 37 mg/100 g), trans-β-karoten (yaklaşık 18 mg/100 g), ve trans-zeaksantin (yaklaşık 6 mg/100 g) gibi karotenoit yapısındaki bileşikler açısından iyi bir kaynak olarak değerlendirilmektedir. *M. oleifera* yapraklarının ayrıca önemli miktarda esansiyel amino asit içerdiği ve alfa linoleik asit açısından zengin olduğu bulunmuştur. *M. oleifera* bitkisi, henüz gıda uygulamalarında tam olarak değerlendirilmeyen, muazzam potansiyele sahip mucize bir bitki olarak görülmektedir. *M. oleifera* yaprak, tohum ve çiçek tozunun hamur, mısır lapası, ekme, bisküvi, yoğurt, peynir gibi çeşitli gıda uygulamalarında ve çorba yapımında sertleştirici olarak kullanılmasının elverişli olacağı bildirilmiştir [50].

M. oleifera'daki flavonoidlerin ve diğer fitokimyasalların kronik hastalıklar üzerindeki etkilerini belirlemek için eczacılar, kimyagerler, beslenme uzmanları, epidemiyoloji uzmanları ve klinisyenler, mühendisler ve bitki metabolizması konusundaki diğer uzmanlar arasındaki iş birliğine ihtiyaç bulunmaktadır. Bitkinin oluşmuş bir hastalığın tedavisinden ziyade, hastalıkları önleme amacıyla sağlıklı insanlarda kullanılması daha önemli ve faydalıdır. Bu yaklaşımı hayata geçirmek amacıyla *M. oleifera* ile ilgili gıda bilgisinin ve etkili diyet stratejilerinin geliştirilmesinin gerekliliği konusuna dikkat çekilmektedir [51].

M. oleifera'nın, besinlerin değerini artırmak için besin takviyesi olarak da kullanılabilceği bildirilmiştir. Bu bitki çok yönlü faydaları ile sağlıklı ve daha parlak bir gelecek için sürdürülebilir

kalkınma hedeflerine ulaşmada umut verici olarak görülmektedir [52]. Ayrıca, yağ asitleri açısından zengin olan tohum yağının zeytinyağına alternatif bir kaynak olarak kullanılabilirliği de bitkinin besin olarak değerlendirilme potansiyelini göstermektedir.

Yapılan çalışmalar *M. oleifera* bitkisinin antimikrobiyal, antiviral, antioksidan, antidiyabetik, antikanser ve kardiyovasküler sistem üzerinde koruyucu etkileri olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, bitkinin antikanser aktivite potansiyeli ile ilgili daha kapsamlı araştırmalar yapılarak etki mekanizmasının ve etkiden sorumlu olan etken maddelerin aydınlatılması gerekmektedir.

M. oleifera zengin vitamin, mineral, protein ve yağ asidi içeriğinden dolayı beslenmede kullanım açısından oldukça yüksek bir potansiyele sahip bir bitkidir. Hayvan yemi olarak da kullanılan bitkinin farklı kullanım alanları arasında; tohumlarının içeriğindeki proteinler nedeniyle su arıtmada kullanımı ve biyodizel olarak kullanımı bulunmaktadır.

Sonuç olarak, zengin bir fitokimyasal içeriğe ve farklı biyolojik etkinliğe sahip olan ve kolay yetişen *Moringa oleifera* bitkisi konusunda farkındalığın artırılarak, bitkinin beslenme ve besin takviyesi potansiyelinin önemi topluma aktarılmalı, içeriğinde bu bitkinin yer aldığı katma değeri yüksek ürünler elde edilerek toplum sağlığı açısından değerlendirilmeli, böylece toplum sağlığı açısından ekonomik ve sağlığa yararlı gelişmelerin önü açılmalıdır.

YAZAR KATKILARI

Kavram: G.S.İ., B.M.; Tasarım: G.S.İ., B.M.; Denetim: G.S.İ.; Veri Toplama ve/veya işleme: B.M.; Analiz ve/veya yorumlama: B.M., G.S.İ.; Literatür taraması: B.M., G.S.İ.; Makalenin yazılması: B.M., G.S.İ.; Kritik inceleme: G.S.İ., B.M.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Ghazali, Hasanah M., Mohammed, Abdulkarim Sabo. (2011). Moringa (*Moringa oleifera*) Seed Oil. In: Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention, (pp. 787-793).
2. Abd Rani, N. Z., Husain, K., Kumolosasi, E. (2018). Moringa Genus: A Review of Phytochemistry and Pharmacology. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 108. [\[CrossRef\]](#)

3. The Plant List Web site. (2021). From <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=moringa> Erişim tarihi: 21.03.2021.
4. Saa, Romuald, W., Fombang, Edith, N., Ndjantou, Elie, B., Njintang, Nicolas, Y. (2019). Treatments and uses of Moringa oleifera seeds in human nutrition: A review. *Food science & nutrition*, 7(6), 1911-1919. [\[CrossRef\]](#)
5. Mahfuz, S., Piao, X. S. (2019). Application of Moringa (Moringa oleifera) as Natural Feed Supplement in Poultry Diets. *Animals (Basel)*, 9(7). [\[CrossRef\]](#)
6. Parrotta, J. A. (1993). Moringa Oleifera Lam: Resedá, Horseradish Tree, Moringaceae, Horseradish-tree Family. International Institute of Tropical Forestry. US Department of Agriculture, Forest Service.
7. Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., Bertoli, S. (2015). Cultivation, Genetic, Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of Moringa oleifera Leaves: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 12791-12835. [\[CrossRef\]](#)
8. Richter, Nahid, Siddhuraju, Perumal, Becker, Klaus. (2003). Evaluation of nutritional quality of moringa (Moringa oleifera Lam.) leaves as an alternative protein source for Nile tilapia (Oreochromis niloticus L.). *Aquaculture*, 217(1-4), 599-611. [\[CrossRef\]](#)
9. Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., Bertoli, S. (2016). Moringa oleifera Seeds and Oil: Characteristics and Uses for Human Health. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12). [\[CrossRef\]](#)
10. Kayode, R. M., Afolayan, A. J. (2015). Cytotoxicity and effect of extraction methods on the chemical composition of essential oils of Moringa oleifera seeds. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 16(8), 680-689. [\[CrossRef\]](#)
11. Gharsallah, Karima, Rezig, Leila, Msaada, Kamel, Chalh, Abdellah, Soltani, Taoufik. (2021). Chemical composition and profile characterization of moringa oleifera seed oil. *South African Journal of Botany*, 137, 475-482. [\[CrossRef\]](#)
12. Zhao, Beibei, Li, Hua, Lan, Tao, Wu, Di, Chen, Zhicheng. (2019). Characterization of the Chemical Composition of Chinese Moringa oleifera Seed Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 96(5), 523-533. [\[CrossRef\]](#)
13. Mbah, B. O., Eme, P. E., Ogbusu, O. F. (2012). Effect of cooking methods (boiling and roasting) on nutrients and anti-nutrients content of Moringa oleifera seeds. *Pakistan Journal of Nutrition*, 11(3), 211. [\[CrossRef\]](#)
14. Tsaknis, J., Lalas, S., Gergis, V., Dourtoglou, V., Spiliotis, V. (1999). Characterization of Moringa oleifera variety Mbololo seed oil of Kenya. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11), 4495-4499. [\[CrossRef\]](#)
15. Brunelli, D., Tavecchio, M., Falcioni, C., Frapolli, R., Erba, E., Iori, R., D'Incalci, M. (2010). The isothiocyanate produced from glucomoringin inhibits NF- κ B and reduces myeloma growth in nude mice in vivo. *Biochemical Pharmacology*, 79(8), 1141-1148. [\[CrossRef\]](#)
16. Singh, R. G., Negi, P.S., Radha, C. (2013). Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of Moringa oleifera seed flour. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1883-1891. [\[CrossRef\]](#)

17. Teixeira, E. M., Carvalho, M. R., Neves, V. A., Silva, M. A., Arantes-Pereira, L. (2014). Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Food Chemistry*, 147, 51-54. [\[CrossRef\]](#)
18. Özcan, M. M., Ghafoor, K., Al Juhaimi, F., Ahmed, I. A. M., Babiker, E. E. (2019). Effect of cold-press and soxhlet extraction on fatty acids, tocopherols and sterol contents of the *Moringa* seed oils. *South African Journal of Botany*, 124, 333-337. [\[CrossRef\]](#)
19. Koike, M. K., Kochi, A. K., Pinto, D. Y. G. (2020). Use of *Moringa Oleifera* Seeds in Water Treatment. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 114(6), 1038-1039. [\[CrossRef\]](#)
20. Gopalakrishnan, Lakshmipriya, Doriya, Kruthi, Kumar, Devarai, Santhosh. (2016). *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science and Human Wellness*, 5(2), 49-56. [\[CrossRef\]](#)
21. Kou, X., Li, B., Olayanju, J. B., Drake, J. M., Chen, N. (2018). Nutraceutical or Pharmacological Potential of *Moringa oleifera* Lam. *Nutrients*, 10(3). [\[CrossRef\]](#)
22. Prabakaran, Mayakrishnan, Kim, Seung-Hyun, Sasireka, Asokan, Chandrasekaran, Murugesan, Chung, III-Min. (2018). Polyphenol composition and antimicrobial activity of various solvent extracts from different plant parts of *Moringa oleifera*. *Food Bioscience*, 26, 23-29. [\[CrossRef\]](#)
23. Xiong, Y., Rajoka, M. S. R., Mehwish, H. M., Zhang, M., Liang, N., Li, C., He, Z. (2021). Virucidal activity of *Moringa A* from *Moringa oleifera* seeds against Influenza A Viruses by regulating TFEB. *International Immunopharmacology*, 95, 107561. [\[CrossRef\]](#)
24. Dhakad, A. K., Ikram, M., Sharma, S., Khan, S., Pandey, V. V., Singh, A. (2019). Biological, nutritional, and therapeutic significance of *Moringa oleifera* Lam. *Phytotherapy Research*, 33(11), 2870-2903. [\[CrossRef\]](#)
25. Jacques, A. S., Arnaud, S. S., Frejus, O. O., Jacques, D. T. (2020). Review on biological and immunomodulatory properties of *Moringa oleifera* in animal and human nutrition. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 12(1), 1-9. [\[CrossRef\]](#)
26. Li, Y. J., Ji, Q. Q., Wang, Z., Shen, L. H., He, B. (2020). *Moringa oleifera* seeds mitigate myocardial injury and prevent ventricular failure induced by myocardial infarction. *American Journal of Translational Research*, 12(8), 4511-4521. [\[CrossRef\]](#)
27. Fatoumata, B. A., MamadouSaïdou, B. A. H., Mohamet, Sene, Joseph, Koulanzo, S., Modou, Mbacké, G., El, H. B. A. (2020). Antidiabetic properties of *Moringa oleifera*: A review of the literature. *Journal of Diabetes and Endocrinology*, 11(1), 18-29. [\[CrossRef\]](#)
28. Gupta, R., Mathur, M., Bajaj, V. K., Katariya, P., Yadav, S., Kamal, R., Gupta, R. S. (2012). Evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of *Moringa oleifera* in experimental diabetes. *Journal of Diabetes*, 4(2), 164-171. [\[CrossRef\]](#)
29. Ma, Z. F., Ahmad, J., Zhang, H., Khan, I., Muhammad, S. (2020). Evaluation of phytochemical and medicinal properties of *Moringa (Moringa oleifera)* as a potential functional food. *South African Journal of Botany*, 129, 40-46. [\[CrossRef\]](#)

30. Villarruel-Lopez, A., Lopez-de la Mora, D. A., Vazquez-Paulino, O. D., Puebla-Mora, A. G., Torres-Vitela, M. R., Guerrero-Quiroz, L. A., Nuno, K. (2018). Effect of *Moringa oleifera* consumption on diabetic rats. *BMC Complementary Alternative Medicine*, 18(1), 127. [\[CrossRef\]](#)
31. Vargas-Sanchez, K., Garay-Jaramillo, E., Gonzalez-Reyes, R. E. (2019). Effects of *Moringa oleifera* on Glycaemia and Insulin Levels: A Review of Animal and Human Studies. *Nutrients*, 11(12). [\[CrossRef\]](#)
32. Haber, S. L., McMahon, R. P., Barajas, J., Hayes, A. R., Hussein, H. (2020). Effects of *Moringa oleifera* in patients with type 2 diabetes. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 77(22), 1834-1837. [\[CrossRef\]](#)
33. Suphachai, Charoensin. (2014). Antioxidant and anticancer activities of *Moringa oleifera* leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(7), 318-325. [\[CrossRef\]](#)
34. Islam, Z., Islam, S. M. R., Hossen, F., Mahtab-Ul-Islam, K., Hasan, M. R., Karim, R. (2021). *Moringa oleifera* is a Prominent Source of Nutrients with Potential Health Benefits. *International Journal of Food Science*, 2021, 6627265. [\[CrossRef\]](#)
35. Wisitpongpun, P., Suphrom, N., Potup, P., Nuengchamngong, N., Calder, P. C., Usuwanthim, K. (2020). In Vitro Bioassay-Guided Identification of Anticancer Properties from *Moringa oleifera* Lam. Leaf against the MDA-MB-231 Cell Line. *Pharmaceuticals (Basel)*, 13(12). [\[CrossRef\]](#)
36. Karim, N. A. A., Ibrahim, M. D., Kntayya, S. B., Rukayadi, Y., Hamid, H. A., Razis, A. F. A. (2016). *Moringa oleifera* Lam targeting chemoprevention. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(8), 3675-3686. [\[CrossRef\]](#)
37. Varalakshmi, K. N., Nair, Shruti. (2011). Anticancer, cytotoxic potential of *Moringa oleifera* extracts on HeLa cell line. *Journal of Natural Pharmaceuticals*, 2(3). [\[CrossRef\]](#)
38. Al-Asmari, A. K., Albalawi, S. M., Athar, M. T., Khan, A. Q., Al-Shahrani, H., Islam, M. (2015). *Moringa oleifera* as an anti-cancer agent against breast and colorectal cancer cell lines. *PloS one*, 10(8), e.0135814. [\[CrossRef\]](#)
39. Szlachetka, Kinga, Kut, Paulina, Stępień, Agnieszka. (2020). Cytotoxic and anticancer activity of *Moringa oleifera*. *European Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 18(3), 214-220. [\[CrossRef\]](#)
40. Saleem, Ammara, Saleem, Mohammad, Akhtar, Muhammad, F. (2020). Antioxidant, anti-inflammatory and antiarthritic potential of *Moringa oleifera* Lam: An ethnomedicinal plant of Moringaceae family. *South African Journal of Botany*, 128, 246-256. [\[CrossRef\]](#)
41. Mansour, M., Sherif, M., Ismail, Y., Abd Elhameed, A., Awad, S. (2021). Study of The Possible Effect of Fluoxetine, *Moringa Oleifera* and Methotrexate in A Rat Model Of Rheumatoid Arthritis. *Benha Medical Journal*. [\[CrossRef\]](#)
42. Balamurugan, V., Muruganandam, L. (2021). In-vitro Anti-Inflammatory and Anti-Arthritic Activity of *Cardiospermum Halicacabum* and *Moringa Oleifera* Leaves Extract. *Journal of Advanced Scientific Research*. [\[CrossRef\]](#)
43. Kumar, V., Verma, A., Ahmed, D., Sachan, N. K., Anwar, F., Mujeeb, M. (2013). Fostered antiarthritic upshot of *moringa oleifera* lam. stem bark extract in diversely induced arthritis in

- wistar rats with plausible mechanism. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(10), 3894-01. [\[CrossRef\]](#)
44. Wang, F., Bao, Y., Zhang, C., Zhan, L., Khan, W., Siddiqua, S., Xiao, J. (2021). Bioactive components and anti-diabetic properties of Moringa oleifera Lam. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-25. [\[CrossRef\]](#)
 45. Chhikara, Navnidhi, Kaur, Amolakdeep, Mann, Sandeep, Garg, M. K., Sofi, Sajad, A., Panghal, A. (2020). Bioactive compounds, associated health benefits and safety considerations of Moringa oleifera L.: an updated review. *Nutrition & Food Science*, 51(2), 255-277. [\[CrossRef\]](#)
 46. Sagrera, A., Montenegro, T., Borrego, L. (2021). Cutaneous Toxicity Due to Moringa oleifera. *Actas Dermosifiliogr (Engl Ed)*. [\[CrossRef\]](#)
 47. Kim, Y., Jaja-Chimedza, A., Merrill, D., Mendes, O., Raskin, I. (2018). A 14-day repeated-dose oral toxicological evaluation of an isothiocyanate-enriched hydro-alcoholic extract from Moringa oleifera Lam. seeds in rats. *Toxicology Reports*, 5, 418-426. [\[CrossRef\]](#)
 48. Saleem, Ammara, Saleem, Mohammad, Akhtar, Muhammad, F. (2020). Antioxidant, anti-inflammatory and antiarthritic potential of Moringa oleifera Lam: An ethnomedicinal plant of Moringaceae family. *South African Journal of Botany*, 128, 246-256. [\[CrossRef\]](#)
 49. Anwar, F., Rashid, U. (2007). Physico-chemical characteristics of Moringa oleifera seeds and seed oil from a wild provenance of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 39(5), 1443-1453. [\[CrossRef\]](#)
 50. Oyeyinka, Adewumi T., Oyeyinka, Samson, A. (2018). Moringa oleifera as a food fortificant: Recent trends and prospects. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(2), 127-136. [\[CrossRef\]](#)
 51. Lin, Mengfei, Zhang, Junjie, Chen, Xiaoyang. (2018). Bioactive flavonoids in Moringa oleifera and their health-promoting properties. *Journal of Functional Foods*, 47, 469-479. [\[CrossRef\]](#)
 52. Kumar, G., Giri, A., Arya, R., Tyagi, R., Mishra, S., Mishra, A. K., Datta, J. (2019). Multifaceted applications of different parts of Moringa species: Review of present status and future potentials. *International Journal of Chemical Studies*, 7(2), 835-842. [\[CrossRef\]](#)



ANTİVİRAL ETKİLİ BİTKİLER

ANTIVIRAL HERBS

Tuğçe İNCE KÖSE¹ , Ayşe Mine GENÇLER ÖZKAN^{1*} 

¹Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, 06100 Tandoğan-
Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Virüsler, her türlü canlı organizmayı enfekte edebilen ajanlardır ve en önemli konaklar insanlar, hayvanlar, bitkiler, bakteriler ve mantarlardır. Viral hastalıklar dünya çapında ciddi morbidite ve mortaliteden sorumludur, halk sağlığı için büyük bir tehdittir ve tüm dünyada önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Bu grup içinde son zamanlarda öne çıkan Coronavirüsler (CoV'ler) Coronaviridae ailesine, Coronavirinae alt ailesine aittir ve hem hayvanları hem de insanları enfekte edebilen büyük (genom boyutu 26–32 kb), zarflı, tek sarmallı ribonükleik asit (RNA) virüsleridir. Dünya son yirmi yılda betaCoV'ların neden olduğu üç salgın yaşadı: 2002–03'te SARS, 2012'de MERS ve 2019'da ilk kez tanımlanan COVID-19. COVID-19 güncel sağlık probleminiz olarak devamlılığını sürdürmekte ve konuyla ilgili çalışmalar devam etmektedir.

Sonuç ve Tartışma: "Antiviral ajanlar" terimi, virüs içeren aşı veya spesifik antikor dışındaki, virüs bulaşmış konakçının net saptanabilir etkisi için koruyucu veya terapötik bir etki üretebilen maddeler olarak çok geniş terimlerle tanımlanmıştır. Doğa güçlü antiviral etkiye sahip çok sayıda farklı bitki türü ile insanlığın virüsler karşısındaki çaresizliğine derman olma potansiyeline sahiptir. Antiviral etkiye sahip bitkilerin taranması sırasında, halk tıbbında kullanılan bitkilere odaklanmak, değerli kadim bilgiyi bilimsel bir zeminde ele alarak insanlığa sağlanacak yararı en üst düzeye çıkarmak- zaman ve emek tasarrufu sağlamak açısından büyük önem taşır. Bu derlemede viral hastalıklar ve bu hastalıklarda kullanılan, etkili olduğu belirlenen bitkilerden bahsedilmiştir.

Anahtar Kelimeler: HIV/AIDS, herpes simplex, influenza, koronavirüs, viral hepatit

ABSTRACT

Objective: Viruses are agents that can infect all kinds of living organisms, and the most important hosts are humans, animals, plants, bacteria and fungi. Viral diseases are responsible for serious morbidity and mortality worldwide, are a major threat to public health, and remain a major problem worldwide. The recently prominent Coronaviruses (CoVs) within this group belong to the Coronaviridae family, subfamily Coronavirinae, and are large (genome size 26–32 kb), enveloped, single-stranded ribonucleic acid (RNA) viruses that can infect both animals and humans. The world has experienced three epidemics caused by

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Ayşe Mine Gençler Özkan
e-posta / e-mail: gencler_65@yahoo.com, Tel. / Phone: +03122033110

betaCoVs in the last two decades: SARS in 2002–03, MERS in 2012, and COVID-19, first identified in 2019. COVID-19 continues to be our current health problem and studies on the subject continue.

Result and Discussion: *The term "antiviral agents" is defined in very broad terms as substances other than virus-containing vaccine or specific antibody that can produce a protective or therapeutic effect for the clearly detectable effect of the infected host.*

Nature has the potential to cure humanity's helplessness against viruses with many different plant species with strong antiviral effects. During the screening of plants with antiviral effects, focusing on plants used in folk medicine is of great importance in terms of maximizing the benefit to humanity - saving time and effort by dealing with valuable ancient knowledge on a scientific basis.

In this review, viral diseases and the plants used in these diseases and determined to be effective are mentioned.

Keywords: *HIV/AIDS, herpes simplex, influenza, coronavirus, viral hepatitis*

GİRİŞ

Virüsler, her türlü canlı organizmayı enfekte edebilen ajanlardır ve en önemli konaklar insanlar, hayvanlar, bitkiler, bakteriler ve mantarlardır. Bununla birlikte, az sayıda virüs birden fazla organizmaya bulaşabilir [1].

Viral hastalıklar dünya çapında ciddi morbidite ve mortaliteden sorumludur, halk sağlığı için büyük bir tehdittir ve tüm dünyada önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Dünyanın farklı bölgelerinden bir dizi viral hastalık vakası bildirilmiştir. Viral hastalıklar için spesifik tedavi eksikliği ve çoğu ilacın kısıtlı terapötik etkinliği, önleyici tedbirlerin aşılara bağımlı olmasına yol açmıştır. Bu hastalıkların ortak tedavisinde çeşitli ilaçlar kullanılır, ancak bazı patojenik virüslerin dirençli suşları senaryoyu kötüleştirir ve bu ilaçların hastalar üzerinde bazı ciddi yan etkileri vardır. Günümüzde geleneksel ilaçlar, terapötik potansiyelleri için kapsamlı araştırma programları ile yeniden değerlendirilmektedir. Şifalı bitkiler, tarih öncesi çağlardan beri geleneksel sağlık sistemlerinde kullanılmaktadır ve dünyadaki nüfusun büyük çoğunluğu için hala en önemli sağlık kaynağıdır. Günümüzde dünya çapında insanların % 70-80'inin geleneksel bitkisel ilaçları kullandığı tahmin edilmektedir [2].

Bu bitkilerin birçoğu geçmişte viral enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılmış olabilir, ancak ilk olarak antiviral ajan olarak geliştirilmelerine duyulan ilgi, Boots ilaç şirketinin (Nottingham, İngiltere) 288 bitkiyi anti-influenza aktivitesi için tarama çabalarıdır. Daha sonraki çalışmalar, şifalı bitki ekstrelerinin çeşitli virüslerin replikasyonu üzerindeki inhibitör etki gösterdiğini bildirmiştir [3].

Bitki alemi tek hücreli mikroskobik bitkilerden uzun ömürlü dev ağaçlara kadar çok farklı yapıda canlı içerir. Antiviral bileşenlerin tanımlanması için her bir bitkinin veya ayrı ayrı bitki kısımlarının (gövde, yapraklar, kökler, çiçekler, ağaç kabuğu gibi) taranması imkânsızdır. Tıbbi bitkilerin antiviral özellikleri ile ilgili mevcut bilgiler subjektif bilgilere dayanmaktadır. Ayrıca yeni tanımlanan fito-bileşenlerin özelliklerine dayanan bitkilerin antiviral özelliklerinin veya fitokimyasal olarak taranan ürünlerin örnekleri de vardır. Böyle bir örnek potansiyel bir antiviral bileşik, siyanovirin N (CV-N), siyanobakteri *Nostoc elliposporum*'dan izole edilen 11-kDa proteindir [3].

"Antiviral ajanlar" terimi, virüs içeren aşı veya spesifik antikor dışındaki, virüs bulaşmış konakçının net saptanabilir etkisi için koruyucu veya terapötik bir etki üretebilen maddeler olarak çok geniş terimlerle tanımlanmıştır. 1930'ların sonlarında penisilin keşfinden kaynaklanan antibiyotik arayışından farklı olarak, antiviral ajanlar araştırması 1950'lerde başladı, ancak 1964'te bir atılım yaptı. Bu yönde erken başarı, çiçek hastalığı profilaksisi için metisazon kullanımını ve herpes keratitinin tedavisi için idoksuridin kullanımını içermektedir [4].

Özellikle *herpes simplex* virüsü tip 2 (HSV-2), HIV, hepatit B virüsü (HBV), poxvirüs ve ciddi akut solunum sendromu (SARS) virüsü ile ilişkili ortaya çıkan viral enfeksiyonlar, çeşitli bitki ekstraktları tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilmiştir. Bu çalışmaların çoğunda tıbbi bitkilerin ya suda çözünür ya da alkollü ekstraktları kullanılmıştır ve sınırlı çabalar, antiviral etkiler sergileyen aktif doğal bileşenlerin tanımlanmasına yöneliktir. Ayrıca, geleneksel antiviral ajanlara dirençli viral suşlara karşı bitki ekstraktlarının antiviral potansiyelini gösteren son çalışmalar, modern ilaç keşif uygulamalarına meydan okumuş ve tıbbi bitkilerin doğal antiviral bileşenlerine olan ilgiyi artırmıştır [3].

Bitki ekstraktlarının antiviral etkileri ile ilişkili moleküler mekanizmalar farklı virüsler söz konusu olduğunda değişebilir. Bununla birlikte, bitki ekstraktlarının, karmaşık bir immün sistemi olan insan vücudunun doğal antiviral savunmasını artırma potansiyelleri kullanabilir. Yakın geçmişte bir dizi çalışma, antiviral özelliklere sahip bitki ekstraktlarının immün sistemi uyarıcı özelliklerini araştırmıştır. Örneğin tıbbi bitki *Heracleum maximum* W. Bartram (Umbelliferae) kökü üzerinde yapılan çalışmalar ekstraktların antifungal ve antibakteriyel özelliklerinin yanında antiviral etkilere sahip, makrofaj aktivasyonu tahlilinde Interlökin 6 (IL-6) üretimini artırmak suretiyle immün sistemi uyarıcı etkiye sahip olduğunu göstermiştir [3].

İmmünomodülatör etkinin yanı sıra, ilginç bir bulgu da bitki ekstraktlarının geniş spektrumlu antiviral yapısıdır. Bu, tek bir fitokimyasal veya bir dizi farklı bitki bileşeni ile ilişkili olabilir. Bu gibi birkaç gözlemden bazıları şunlardır: (i) *Trifolium* türlerinden elde edilen Secomet-V isimli ekstre, insan papilloma virüsü gibi bir dizi bulaşıcı virüse karşı antiviral etki göstermiştir, *Pandanus amaryllifolius* Roxb. yapraklarından izole edilmiş bir lektinin de, HSV-1 ve influenza virüsü suşu H1N1'e karşı antiviral etkiye sahip olduğu belirlenmiştir [3].

Antiviral Aktivite Hedefleri

Viral Zarf

Virüs zarfı, çoğu virüsün sahip olduğu, iki tabakalı, lipoprotein yapısında bir zarfıdır. Bazı virüsler karmaşık bir dış tabakanın parçası olarak lipid içermekle birlikte, iki tabakalı bir zarf yapısı açıkça gösterilmedikçe bunlar genellikle zarflı olarak kabul edilmez. Zarflı virüsler çoğunlukla hücre zarından geçer hücre bozulmadan kalır [4].

Zarflı virüsler için, viral zarf antiviral kemoterapi için iyi bir hedefdir, çünkü bunların yok edilmesi virüsü savunmasız hale getirir ve virüsün enfekte etme gücünü azaltır. Deterjanların ve eterin, viral zarfların lipit bileşenlerini çözdürdükleri veya yok ettikleri bilinmektedir; bunun yanında eter duyarlılığı zarflı ve zarfsız virüsü ayırt etmede kullanılır [4].

Viral Nükleik Asit

Genom dizilimi / nükleik asit bileşeni temelinde, iki grup virüs ortaya çıkar; deoksiribonükleik asit (DNA) virüsleri ve ribonükleik asit (RNA) virüsleri. Nükleik asitler genetik bilgi merkezidir ve konakçı hücrelerde viral yayılım ile ilgili tüm süreçleri yönlendirir. DNA virüsleri ile enfekte olmuş hücrede viral DNA, kendi replikasyonu ve viral spesifik haberci RNA'nın (mRNA) sentezi için bir şablon görevi görür. Viral DNA'nın enzimatik sentezi, konakçı hücrenin DNA polimerazı veya virüs tarafından katalize edilebilir. Bir viral RNA polimerazın viral DNA'yı viral spesifik mRNA'ya transkripte ettiği görülmektedir [4].

Viral Protein

Viral nükleik asitlerin olası viral kemoterapinin hedefleri olarak önemi üzerine tartışma, viral proteinlerinki ile örtüşmektedir. Bu, viral proteinlerin sentezinin nükleik asitlerin katılımı olmadan mümkün olmadığı gerçeğinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, viral proteinler, hem viral yapısal proteinler hem de fonksiyonel proteinler ve enzimler olarak antiviral ilaç uygulaması için benzersiz fırsatlar sunmaktadır. Viral proteinlerinin biyosentez mekanizmaları, normal hücre proteinlerinin poliribozomlar üzerinden sentezine benzemektedir. Viral RNA, ribozomlar, bağlayıcı enzim, peptid sentetaz, translokaz ve muhtemelen konakçı hücreden türetilen başlatma ve sonlandırma faktörlerini gerektiren sentetik işlem için haberci görevi görür. Sentez tamamlandıktan sonra, viral proteinler ribozomdan salınır [4].

Birçok virüsün, hücrel moleküller pahasına virüs nükleik asitlerini tercihen çoğaltmak için kendi spesifik enzimlerini geliştirdiği bilinmektedir ve virüs polimerazlarında genellikle bir antiviral ajana hedef sağlama açısından yeterli özgüllük vardır. Bu yöntem, mevcut spesifik antiviral ilaçlar için kullanılmaktadır [4].

Diğer Hedefler

In vitro çalışmalar, HIV'in adsorpsiyonunu engellemek için kısa peptitlerin ve çözünür CD4'ün kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca, Croton lechleri Müll. Arg. lateksini oluşturan bir oligomerik proantosiyanidin olan SP-303'ün, plazma zarından viral adsorpsiyon ve penetrasyonu inhibe ederek HSV ve RSV üzerinde antiviral etki gösterdiği gösterilmiştir. Amantadinin virüs toplanmasının ve salımının sonraki aşamalarını bloke ettiği bulunmuştur. İlacın viral membran (M2) proteini ve viral hemaglutinin arasındaki etkileşimlere müdahale ettiği düşünülmektedir, böylece nükleokapsidin

örtülmesini bozar, dolayısıyla enfektiviteyi engeller. M2 proteinindeki değişiklikler yoluyla amantidine dirençli mutantlar bildirilmiştir [4].

HIV/AIDS ve Kullanılan Bitkiler

Human Immunodeficiency Virus/İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV) ilk olarak Barré- Sinoussi ve ekibi tarafından 1983 yılında izole edilmiştir. Yapılan serolojik çalışmalar HIV'in; Acquired Immune Deficiency Syndrome/Edinilmiş İmmün Eksikliği Sendromu (AIDS) etkeni olduğunu göstermiştir. HIV'in iki serotipi mevcuttur. Bunlar, tüm dünyada yaygın olan HIV-1 ve daha çok Afrika ülkelerinde görülen HIV-2'dir. HIV-1'in, insana en az 4 zoonotik köken ile bulaştığı düşünülmektedir. Bu bulaşmanın mevcut moleküler filogenetik biyolojik bilgilere göre 1930'lu yıllarda (± 20 yıl) meydana gelmiş olabileceği tahmin edilmektedir. HIV-2 ilk olarak 1986 yılında Clavel ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir. HIV-2, HIV-1'den daha az patojeniktir. Bunun sonucu olarak olgularda daha uzun bir prognoz gözlemlenir, immün yetmezlik işaretlerinin ve AIDS oluşumunun daha geç gerçekleşmesi görülürken, anne-bebek geçiş oranı HIV-1 (%10-40) ile karşılaştırıldığında çok daha düşüktür (%2-7) [5]. AIDS hastaları çoğunlukla karışık, çoklu transfüzyonlu, homoseksüel ve intravenöz ilaç bağımlısıdır. Cinsel bulaşma, HIV enfeksiyonunun bulaşmasının ana yoludur, diğer yollar ise anneden çocuğa bulaşma, kan ürünü nakli, organ nakli ve kirli şırıngalarla ilaç kullanımındır. Şu anda, dünya çapında 37 milyona ulaşan AIDS hasta sayısı ile görülme sıklığı her geçen yıl artmaktadır. AIDS esas olarak yavaş başlangıç, yüksek ölüm oranı ile yorgunluk, ateş ve diğer klinik semptomlarla kendini gösterir. Esas olarak hastaların immün sistemini işgal eder ve immün fonksiyonlarında ciddi hasara neden olur [6].

Tablo 1. HIV'le enfekte bireylerde kullanılan bitkiler [3]

Yaygın isim	Bilimsel adı	Aktivite/Etki
Aloe	<i>Aloe vera</i> (L.) Burm.f.	HIV ve Anti HIV ilaçlarla ilişkili cilt problemleri
Andrographis	<i>Andrographis paniculata</i> (Burm.f.) Nees	İmmünomodülasyon yoluyla antiviral etki
Sarımsak	<i>Allium sativum</i> L.	HIV enfeksiyonu ile ilişkili mantar enfeksiyonu ve paraziter enfeksiyonlar
Zencefil	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe.	Antiretroviral tedavi ile ilişkili bulantı
Melisa	<i>Melissa officinalis</i> L.	HIV ve HSV'ye karşı <i>in vitro</i>
Zeytin yaprağı	<i>Olea europaea</i> L.	<i>In vitro</i> antiviral ve antioksidan
Çay ağacı yağı	<i>Melaleuca alternifolia</i> (Maiden & Betche) Cheel	HIV ile ilişkili pamukçuk (mantar enfeksiyonu)
Ginseng (kök)	<i>Panax ginseng</i> C. Meyer.	HIV enfekte bireylerde tonik etkili
Meyankökü(kök)	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	İmmünostimulan, virüs üretiminin inhibisyonu

Herpes Simplex ve Kullanılan Bitkiler

Herpes simplex, Herpesviridae familyasının bir üyesidir. Herpesviridae, çeşitli düzeylerde insan

enfeksiyonlarına neden olan DNA içeren geniş bir virüs ailesidir. Ağız boşluğunda mukokutanöz lezyonlara veya genital enfeksiyonlara neden olan önemli bir insan patojenidir [7].

İnsan *Herpes simplex* virüsleri, yaşam boyu kalıcı enfeksiyonlar oluşturan ve soğuk yaralardan mononükleoza, doğum kusurlarına ve kanserlere kadar çeşitli hastalıklarla ilişkili olan her yerde bulunan patojenlerdir. Bugüne kadar keşfedilen sekiz insan herpes virüsü, alfa, beta ve gama- herpes virüsler olmak üzere üç alt aileye ayrılmıştır. Alfa-herpes virüsler, *Herpes simplex* 1 ve 2 (HSV-1 ve HSV-2) ve suçiçeği-zoster virüsünden (VZV) oluşur; beta-herpes virüsleri arasında insan sitomegalovirüsü (HCMV), insan herpes virüsü 6 (HHV 6) ve insan herpes virüsü 7 (HHV-7) bulunur; ve gama-herpes virüsler epstein-barr virüsü (EBV) ve Kaposi sarkomu ile ilişkili herpes virüstür (KSHV) [8].

EBV enfeksiyöz mononükleozdan sorumludur ve birkaç malignite ile ilişkilidir. *Varisella zoster* virüsü (VZV) oldukça bulaşıcıdır ve su çiçeği (birincil enfeksiyon) ve zonadan (ikincil enfeksiyon) sorumludur. *Sitomegalovirüs*, astronotlarda yeniden aktifleştiği bilinen tek beta-herpes virüsüdür. *Herpes simplex* virüsü-1 oldukça yaygın ve bulaşıcıdır. Belirti göstermeden hayat boyu vücutta kalabilir [9].

Tablo 2. *Herpes simplex*'te kullanılan bitkiler [3, 10]

Bilimsel adı	Bileşen	Mekanizma/Etki
<i>Podophyllum peltatum</i> L.	Podofilotoksin	HSV 1 inhibisyonu
<i>Euphorbia jolkini</i> Boiss.	Putranjivain A	HSV-2 replikasyonunun geç aşamasını etkiler
<i>Limonium sinense</i> (Girard) Kuntze	Samaranjenin B	Viral replikasyonu engeller
<i>Ranunculus sceleratus</i> L.	Protokateşil aldehit	Viral replikasyonu engeller
<i>Phyllanthus urinaria</i> L.	Geranin	HSV 1 ve HSV 2'yi baskılar

% 1 kurutulmuş *Melissa officinalis* L. ekstresi içeren balsam kremi randomize çift kör, plasebo kontrollü bir çalışmada tekrarlayan *Herpes simplex labialis* enfeksiyonu olan 66 hastada test edilmiştir. Test kremi 5 gün boyunca günde dört kez uygulanmıştır. Balsam kremi ile lezyonlar belirgin şekilde daha hızlı temizlenmiş ve hastalarda daha az kabarcık ve ağrı gözlemlenmiştir [11].

Randomize, plasebo kontrollü bir çalışma, *Herpes simplex labialis* enfeksiyonu olan 149 hastada *Salvia officinalis* L. (adaçayı) ve *Rheum palmatum* L. (ravent) ekstresinin kombinasyonunu araştırmıştır. Hastalar topikal olarak asiklovir (50 mg / g), adaçayı ekstresi (23 mg / g) veya adaçayı ve ravent ekstresi (her biri 23 mg / g) kombinasyonu ile tedavi edilmiştir. Kombine adaçayı-ravent kremi sadece adaçayıdan daha üstün ve asiklovir kadar etkili bulunmuştur [11].

Homoharringtonin (son zamanlarda omasetaksin mepesüksinat olarak bilinir), *Cephalotaxus* cinsinin bazı türlerinden türetilen ve sefalotaksus alkaloid sınıfına ait doğal bir alkaloiddir. Bu ilaç bir

protein sentez inhibitörüdür ve kronik veya hızlandırılmış faz kronik miyeloid lösemisini iyileştirmek için ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Daha evvel yapılan klinik öncesi araştırmalarda, bu bileşik, *Herpes simplex* virüsü 1, suçiçeği-zoster virüsü gibi *Herpes* virüslere karşı güçlü antiviral aktivite ile rapor edilmiştir [12].

İnfluenza ve Kullanılan Bitkiler

Grip, influenza virüsleri tarafından gelişen, akut, ciddi ve salgınlara yol açabilen bir enfeksiyon hastalığıdır. Hastalık solunum yoluyla bulaşır ve kış aylarında daha sık görülür [13].

İnfluenza; insanlarda, influenza A (influenza A cinsi) ve influenza B (influenza B cinsi) virüslerinden (influenza C ve influenza D cinsleri de bilinir) kaynaklanır. İnfluenza virüsü enfeksiyonu ile ilişkili semptomlar, hafif seyreden üst solunum yolu hastalığından farklıdır ve ateş, boğaz ağrısı, burun akıntısı, öksürük, baş ağrısı, kas ağrısı ve bazı durumlarda grip virüsü nedeniyle ölümcül pnömoni veya alt solunum yollarının sekonder bakteriyel enfeksiyonuyla karakterizedir [14].

Tüm influenza virüsleri, segmentli bir genomu olan, negatif-duyarlı tek zincirli RNA virüsleridir. İnfluenza A ve influenza B virüsleri, RNA polimeraz alt birimlerini, viral glikoproteinleri, viral nükleoprotein (NP), matris proteini (M1) ve membran proteini (M2), yapısal olmayan protein NS1 ve nükleer atılım proteinini (NEP) kodlayan sekiz RNA segmenti içerir [14].

İnfluenza için kullanılacak doğal inhibitör arayışı çok eskidir. Geçen yüzyılda, influenza virüsünü inhibe edebilen fitokimyasalların tanımlanması için çeşitli bilimsel çabalar gösterilmiştir. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, birkaç bitkiden izole edilen bazı maddelerin influenza virüsünü inhibe ettiğini göstermektedir. Alkaloidler, flavonoidler, glukozitler, polifenoller, saponinler gibi çok çeşitli yapıdaki fitokimyasallarda anti-influenza aktivitesi belirlenmiştir [3].

H1N1 enfeksiyonuna karşı *Rapanea melanophloeos* (L.) Mez'den (RM) (Myrsinaceae) izole edilen kersetin-3-O- α -L ramnopiranosid'in (Q3R) antiviral aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Madin Darby köpek böbrek hücreleri (MDCK), kombine tedavilerde Q3R ve 100CCID50 / 100 μ l (CCID: hücre kültürü enfeksiyöz doz 50) H1N1'e maruz bırakılmıştır. Daha sonra sırasıyla gerçek zamanlı ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) ve enzim bağlı immünosorbent deneyi (ELISA) ile RNA ve protein seviyelerinde sitokinlerin değerlendirilmesi için test edilmiştir. Başka bir tedavi setinde apoptoz, RhoA GTPaz proteini ve kaspaz-3 aktivitesi tespit edilerek incelenmiştir. Moleküler yerleştirme, Q3R'nin potansiyel anti-influenza aktivitesinin değerlendirilmesi için bir araç olarak kullanılmıştır. RM'den kersetin-3-O- α -L-ramnopiranosid, immünomodülatör özelliklerle influenza enfeksiyonuna karşı önemli ölçüde etkili olmuş, apoptoz yolunu etkilemiş ve 2009 pandemik H1N1'in viral reseptörleri M2 transmembran ve nöraminidaz ve insan RhoA hücre proteinine bağlanma kabiliyetini etkilemiştir [15].

Portulaca oleracea'nın sulu ekstresi (WEPO) pandemik influenza A virüsü (IAV) enfeksiyonunun belirti ve semptomlarını etkili bir şekilde hafiflettiği bulunmuştur. WEPO sitotoksitesisi, hücre canlılığı testi kullanılarak ölçülmüştür. WEPO'nun anti-IAV aktivitesi, plak azaltma deneyi, qPCR ve immüno Floresan deneyi kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmaya göre dolaşımdaki H1N1 ve H3N2 üretimi WEPO tarafından bastırılmıştır. WEPO'nun antiviral aktivitesi, IAV enfeksiyonunun erken evresinde gözlenmiştir. Ayrıca WEPO, virüsün hücrelere bağlanmasını inhibe etmiş ve iyi virüsidal aktivite sergilemiştir, viral enfeksiyonu önlemek için viral yükü 10 dakika içinde önemli ölçüde azaltmıştır [16].

Tablo 3. Inflenzada kullanılan bitkiler [2, 10]

Bilimsel adı	Kullanılan kısım
<i>Bupleurum chinense</i> DC.	Radix Bupleuri
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	Folia Sinensis
<i>Punica granatum</i> L.	Cortex Granatii
<i>Forsythia suspensa</i> (Thunb.) Vahl	Fructus Forsythiae
<i>Morus alba</i> L.	Folium Mori
<i>Isatis tinctoria</i> L.	Radix Isatidis
<i>Lonicera japonica</i> Thunb.	Flos Lonicerae

Viral Hepatit ve Kullanılan Bitkiler

Hepatit karaciğerde, herhangi bir nedenle oluşan iltihaptır. Viral hepatit veya karaciğerin iltihaplanması, hepatit A, B, C, D ve E adlı bir dizi farklı virüsten kaynaklanır. Bu virüslerden herhangi birine maruz kalmak akut enfeksiyona yol açsa da özellikle B, C ve D tipleri kronik enfeksiyona neden olabilmektedir [3].

Hepatit A virüsü (HAV), tipik olarak kontamine yiyecekleri tükettikten veya kontamine nesnelere işledikten sonra fekal-oral yoldan kişiden kişiye bulaşan bir RNA virüsüdür [17].

Hepatit B virüsü (HBV), perkütan veya perinatal maruziyet yoluyla veya HBV ile enfekte kan veya vücut sıvısı ile doğrudan mukozal temastan bulaşan bir DNA virüsüdür [17].

Hepatit C virüsü (HCV), HCV ile enfekte kan veya kan içeren vücut sıvısına maruz bırakılarak (örneğin, IV ilaç kullanımı sırasında HCV kontamine iğnelerin paylaşılmasıyla) bulaşan bir RNA virüsüdür [17].

Hepatit D virüsü, hepatositler içinde bağımsız olarak çoğalan ancak çoğalması için hepatit B yüzey antijeni gerektiren bir virüstür. Hepatit D virüsü (HDV), 1977'de kronik hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonu olan hastalarda keşfedilmiştir. Başlangıçta tanınmayan bir HBV antijeni olduğu düşünülen HDV nükleer

antijeninin daha sonra başlangıçta delta ajanı olarak bilinen yeni bir patojenin bir parçası olduğu keşfedilmiştir. Bilinmeyen nedenlerden ötürü, HBV replikasyonu, HDV ile enfekte kişilerde baskılanır [18].

Hepatit E virüsü (HEV), dünya çapında akut hepatitin ana nedenidir. Enterik olarak bulaşır, ancak karaciğerde çoğalır. Son çalışmalar HEV'in iki forma sahip olduğunu göstermiştir [19].

Viral hepatit için geleneksel tıp esas olarak Euphorbiaceae ailesinin *Phyllanthus* cinsine ait bitkilere odaklanmıştır. Farklı *Phyllanthus* türleri, (*P. amarus* (L.), *P. niruri* (L.) ve *P. urinaria* (L.)) anti- hepatit etkilerini karşılaştırmak üzere çeşitli klinik çalışmalar gerçekleştirilmiştir [3].

Antiviral bileşiklerin taranması, genellikle temsili hayvan modelinin bulunmaması nedeniyle sekteye uğramıştır. Bununla birlikte, insanlarda HBV enfeksiyonu durumunda, ördek hepatit B virüsü (DHBV) modeli mükemmel bir tarama sistemi olarak hizmet etmiştir. *Phyllanthus* türleri DHBV modelindeki antiviral etkileri açısından taranmıştır [3].

Tablo 4. Viral hepatitte kullanılan bitkiler [3, 10]

Bilimsel adı	Virüs	Bileşen / Ekstre	Mekanizma
<i>Scutellariae baicalensis</i> Georgi	HBV	Wogonin	Viral DNA polimeraz inhibisyonu
<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	HBV	Protokateşik aldehit	Viral replikasyon inhibisyonu
<i>Boehmeria nivea</i> L.	HBV	-	HBV üretimini azaltır
<i>Polygonum cuspidatum</i> Siebold & Zucc.	HBV	-	Hepatit B virüsünün inhibisyonu
<i>Saxifraga melanocentra</i> Franch.	HCV	Polifenolik bileşikler	Viral NS3 serin proteaz inhibisyonu

Saflaştırılmış umesu fenolik bileşikleri, Japon kayısısının tuz ekstrallerinden (*Prunus mume* Koehne) elde edilmiştir. Japonya'da Wakayama vilayetinin özel bir ürünü olan *Prunus mume* bitkisinin virüslere karşı güçlü virüsidal aktivite gösterdiği bulunmuştur. Tamamen olgunlaşmış bir meyve, kuru ağırlık bazında % 1 kadar fenolik bileşikler içerir. Ek olarak, fenolik bileşiklerin alkali hidrolizatının karakterizasyonu, bu meyvedeki fenolik bileşiklerin çoğunun hidrosinamik asit türevleri olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu fenolik bileşiklerin vücut yüzeyindeki *Herpes simplex* virüslerinin (HSV) enfeksiyonuna karşı sterilize edici veya önleyici potansiyeli mevcuttur. Bu bileşiklerin farmakolojik kullanımı için antiviral ve virüsidal aktiviteleri *Herpes simplex* virüsü tip 1 (HSV 1) veya tip 2'ye (HSV 2) karşı incelenmiş, olumlu sonuçlar alınmıştır [20].

Birçok virüse karşı, *Eclipta alba* L. Hassk. (Asteraceae) ekstrallerinin güçlü antiviral aktiviteye sahip oldukları kanıtlanmıştır. Ayurvedik tıpta yaprakların taze suyu iştah artırıcı, hafif bağırsak düzenleyici olarak kullanılmasına rağmen, esas olarak kan yoluyla bulaşan hepatite neden olan

virüslerin engellenmesinde tercih edilir [21].

Koronavirüs ve Kullanılan Bitkiler

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından bildirilen ve dünya üzerinde son zamanlarda benzeri görülmemiş bir değişikliğe yol açan koronavirüs pandemisi, küresel olarak koronavirüslere (CoV) olan bilimsel ilginin katlanarak artmasına neden olmuştur [22].

CoV'ler, hayvanların ve insanların solunum ve sindirim sistemlerini etkileyebilir, ancak Guangdong, Çin'de 2002 ve 2003'te şiddetli akut solunum sendromu (SARS), Orta Doğu'da 2013'te solunum sendromu (MERS) patlak verene kadar insanlara bulaşmadığı kabul edilmiştir [23].

Aralık 2019'un sonuna doğru, Çin Wuhan kaynaklı, insandan insana bulaşan ve ciddi bir enfeksiyona neden olan yeni bir koronavirüs (2019-nCoV) tanımlandı. Bu virüs Çin'deki birçok kişiyi etkiledi ve kısa sürede diğer ülkelere yayıldı. 30 Ocak 2020'de Dünya Sağlık Örgütü Genel Direktörü, 2019-nCoV'un patlak vermesinin uluslararası endişe duyulan bir halk sağlığı acil durumu oluşturduğunu ilan etti ve Uluslararası Sağlık Tüzükleri kapsamında geçici tavsiyeler verdi. Halen devam eden bu salgın nedeniyle mümkün olan en kısa sürede yeni önleyici ve tedavi edici ajanların keşfi büyük önem taşımaktadır [24].

Koronavirüsler (CoV'ler) Coronaviridae ailesine, Coronavirinae alt ailesine aittir ve hem hayvanları hem de insanları enfekte edebilen büyük (genom boyutu 26–32 kb), zarflı, tek sarmallı ribonükleik asit (RNA) virüsleridir. Genotipik ve serolojik özelliklerine dayanarak, virüsler dört türe ayrılır: Alfa, Beta, Gamma ve Delta CoV. Şu anda, insanları enfekte edebilen tüm tanımlanmış CoV'ler ilk iki cinse aittir. Dünya son yirmi yılda betaCoV'ların neden olduğu üç salgın yaşadı: 2002–03'te SARS, 2012'de MERS ve 2019'da ilk kez tanımlanan COVID-19 [22].

SARS ve MERS-CoV, en büyük RNA genomları olarak bilinen polisistronik artı sarmallı RNA içeren zoonotik virüslerdir. 26 ila 32 kilobaz uzunluğundaki koronavirüslerin, viral zarfta bulunan çok büyük (200 K) glikoprotein S, bir transmembran glikoprotein ve dahili fosforile nükleokapsid proteininden oluşan üç ana proteine sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda, HCoV-19'un hem SARS-CoV hem de MERS-CoV ile yakından ilişkili olduğu ortaya çıktı. Genomunun yaklaşık % 70-80'ini SARS-CoV ile paylaştığı bildirilmiştir. Son HCoV-19 genom sekanslaması, insandan izole edilen β CoV suşlarına (SARS-CoV) göre farklı bir genom kompozisyonuna işaret etti [25].

Özel aşılar ve antiviral ajanlar viral enfeksiyonu önlemek ve tedavi etmek için en etkili yöntemler olmakla birlikte, 2019-nCoV'yi hedefleyen henüz etkili bir tedavi yoktur. Bu tedavilerin geliştirilmesi aylar veya yıllar gerektirebilir, yani mümkünse daha acil bir tedavi veya kontrol mekanizması bulunmalıdır. Geleneksel Çin tıbbında kullanılan bazı bitkiler, bu amaçla potansiyel olarak değerli bir kaynak sunmaktadır. Bulaşıcı hastalığı kontrol etmek için bitkisel tedavinin etkinliği 2003 şiddetli akut

solunum sendromu (SARS) salgını sırasında gösterilmiştir. Çin hükümeti, bu yeni viral pnömuniyle mücadelede bitkilerin kullanımını teşvik etmektedir. Bununla birlikte, bitkisel tedavinin uygulanması ve esas olarak bitki türü, hastanın semptomları veya belirtileri tarafından yönlendirilir [24].

Tüm bu araştırmalar, bu virüsün solunum sıkıntısına neden olduğunu ve bunu akılda tutarak, immünomodülatör, antiviral (özellikle solunum yolu enfeksiyonları için) ve diğer biyolojik aktivitelerle sahip yaygın ve kolay erişilebilir birkaç fonksiyonel bitkinin belgelendiğini açıkça göstermektedir. Örneğin, *Glycyrrhiza glabra* L. 'dan (Fabaceae) izole edilen glisirizin, Almanya Frankfurt Üniversitesi Klinik Merkezine başvuran SARS-CoV ile enfekte hastalar üzerinde test edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, test edilen diğer bileşiklerle karşılaştırıldığında, Vero hücrelerinde 67 seçicilik endeksi ile SARS-CoV replikasyonunun en etkili inhibitörünün glisirizin olduğunu göstermiştir [26].

Geleneksel olarak, kurutulmuş kökler önce ezilir ve daha sonra bir ekstre hazırlamak için kaynatılır. Ekstre koyu renkli bir macun veya toz haline getirilebilir ve farklı tipte kronik enfeksiyonları tedavi etmek için ağızdan alınabilir. Kök, immünomodülasyon, antiviral ve diğer biyolojik aktivitelerden sorumlu olan glisirizin adlı bir saponin içerir. Yapılan bir çalışmada glisirizik asit ile tedavi edilen farelerin, beyaz kan hücrelerinde, kemik iliği hücreliliğinde ve alfa esteraz pozitif hücrelerde bir artış gösterdiğini bildirilmiştir. Glisirizin, T hücrelerinin ve sitokinlerin (IFN-c ve IL-10) üretimini artırmıştır ve IL-12 üretimini azaltmıştır. Meyan kökü ile ilgili kapsamlı araştırmalar, güçlü immünomodülasyon aktivitesine sahip olduğunu ve vücudun immün sistemini patojenik enfeksiyonlara karşı geliştirmede yararlı olabileceğini göstermektedir [23].

Tayvanlı bir ekip, *Toona sinensis* Roem'in (TSL) (syn. *Cedrela sinensis* Juss., Meliaceae) yaprak ekstralarının SARS-CoV (FFM 1 izolatu) üzerinde güçlü bir aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir. Sitopatojenik etkileri (CPE) enfeksiyondan 72 saat sonra belirlenmiş ve viral yükte azalma ölçülmüştür. Kaynatma ve düzenli tekniklerle hazırlanan yaprakların ham ekstresinin (TSL-1) ve nanopartiküle edilmiş ekstresinin (TSL-nm) bir kısmı ayrı ayrı test edilmiştir. TSL ekstralarının ümit verici bir Sars-CoV aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur [25].

Organosülfür bileşikleri soğan (örneğin *Allium cepa*), sarımsak (ör. *Allium sativum*) ve pırasa (*Allium porrum*) gibi *Allium* cinsi bitkilerde bol miktarda bulunur. Genel olarak organosülfür bileşikleri biyokimyasal yapılarında kükürt içeren organik makromoleküllerdir. SARS-CoV-2 için yapılan bir *in-siliko* çalışmada, *A. porrum*'daki organosülfür bileşiklerinin insan ACE2 enzimlerinin inhibisyonunda önemli bir potansiyele sahip olabileceği ve bu nedenle SARS-CoV-2'nin hücrelerle bağlantısının inhibisyonunda güçlü bir etki göstereceği bildirilmiştir [27].

Sarımsak, eski zamanlardan beri en popüler bitkisel ilaçlardan biridir. Bal ile veya balsız karıştırılmış taze ezilmiş sarımsakların, immün sistemini güçlendirebileceği ve ayrıca sülfoksit proteinler ve polifenoller dahil olmak üzere birkaç biyoaktif sülfür içeren bileşiğin varlığından

kaynaklanabilecek antiviral ve diğer biyolojik özelliklere sahip olabileceği öne sürülmüştür. Birkaç çalışma, sarımsağın immün hücreleri ve genel olarak immünite üzerinde yararlı etkileri olduğunu göstermiştir. Örneğin Kuttan (2000), kükürt bileşiklerinin (dialil sülfür, dialil disülfür ve alil metil sülfür) farelerde immün sistemi uyarıcı etkilerini bildirmiştir. İncelenen bileşikler arasında, dialil disülfid ile tedavi edilen fareler, diğer bileşiklerle tedavi edilen farelere göre yüksek seviyede beyaz kan hücreleri (17900 hücre / mm³) ve antikor seviyeleri göstermiştir. Bu bileşikler ayrıca kemik iliği hücreliliğini, α -esteraz pozitif hücre sayısını ve dalaktaki plak oluşturan hücrelerin sayısını önemli ölçüde artırmıştır. Sarımsağın immün sistemi uyarıcı potansiyeli klinik uygulamalarda faydalı olabilir, çünkü hem doğal hem de spesifik hücre bağışıklığını artırabilir ve konakçı direncini artırabilir [23].

SARS-CoV ve influenza virüslerine benzer şekilde, solunum sinsityal virüsü (RSV) de akut solunum yolu enfeksiyonlarına neden olur ve küresel olarak farklı yaşlardaki insanlar için büyük bir tehdit olarak kabul edilir. *Berberis vulgaris* L.'den izole edilen bir alkaloid olan berberin test edilmiş; mRNA ve viral proteinlerin sentezini azaltarak epitel hücrelerinde RSV replikasyonunu önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur [23].

Baikalin, *Scutellaria* cinsindeki bitkilerin ana bileşenlerinden biridir ve *Scutellaria baicalensis* Georgi (Lamiaceae) bitkisinin farmasötik özelliklerinin nedenidir. *Scutellaria baicalensis*'ten ekstre edilen flavonoidlerin *in vitro* olarak değerlendirilmesi, lipopolisakkarit ile aktive edilen hücreler üzerinde önemli bir antiviral aktivite göstermiştir. COVID-19 hastalığında etkinin oluşması için yapılan baikalin *in-siliko* çalışması, baikalinin anjiyotensin dönüştürücü enzim 2'yi (ACE2) inhibe ettiğini göstermiştir. *Scutellaria baicalensis*'in ekstresinin, COVID-19 hastalığında yapılan *in vitro* deneyde 3CLPro aktivitesini azalttığı gözlemlenmiştir [27].

Curcuma longa L.'dan elde edilen kurkumin, 30 μ M konsantrasyonda hücre kültüründe influenza virüsü sayısını % 90'dan fazla azaltmıştır; bunun nedeni hemaglutinin, nöraminidaz ve matris proteini gibi viral proteinlerin sentezini etkilemiş olması olabilir [23].

Strobilanthes cusia (Nees) Kuntze'nın viral RNA genom sentezini bloke ettiği ve HCoV'yi hedefleyen papain benzeri proteaz aktivitesini indüklediği tespit edilmiştir. *Clerodendrum inerme* Gaertn bitkisinin, başka bir bitkinin viral ribozomunu inaktive etme potansiyeline sahip olduğu bulunmuş, bu da SARS-CoV-2 protein translasyonunu hedefleyen bir ilaç olarak faydası için araştırılabileceğini göstermiştir [28].

Yapılan bir çalışmada, mannoz, N-asetil glukozamin, glikoz, galaktoz ve N-asetil galaktozamini içeren bitki lektinlerinin *in vitro* olarak SARS-CoV'a karşı aktiviteleri değerlendirilmiştir. En belirgin anti-koronavirüs aktivitesinin esas olarak mannoz bağlayıcı lektinler arasında bulunduğu görülmüştür. Buna örnek olarak *Hippeastrum hybrid*, *Allium ursinum* L., *Tulipa hybrid*, *Sambucus nigra* L., *Viscum album* L., *Iris hybrida* Retz. türleri verilebilir [29].

Tablo 5. İnsan koronavirüs suşlarına karşı doğal ürünlerin aktiviteleri [22]

Virüs türü	Bitki adı	Anahtar bileşik	EC50 ya da IC50
SARS-CoV-2	<i>Camellia sinensis</i> L.	Theaflavin	Bilgi yok
SARS-CoV-2	<i>Morus nigra</i> L.	Agglutinin	22±6 µg/ml
SARS-CoV(BJ001 ve BJ006)	<i>Lycoris radiata</i> (L'Hér.) Herb.	Likorin	2.1-2.4 µg/ml
SARS-CoV FFM1	<i>Laurus nobilis</i> L.	β-osimen; 1,8 sineol	120±1,2 µg/ml
SARS-CoV FFM1	<i>Thuja orientalis</i> L.	α-pinen; α-sedrol	130±0,4 µg/ml
SARS-CoV PUMC01 F5	<i>Cinnamomi</i> sp.	Prosiyanidin A2	10,7±0,4 µg/ml
SARS-CoV kentsel	<i>Urtica dioica</i> L.	Agglutinin	2,6±3,7 µg/ml
SARS-CoV CLpro	<i>Artemisia annua</i> L.	Aurantiamid asetat	Bilgi yok
SARS-CoV 3CLpro	<i>Rheum palmatum</i> L.	Antrakinin	13,76±0,03 µg/ml
MERS-CoV EMC/2012	<i>Griffithsia</i> sp.	Griffitsin	~0,125 µg/ml
MERS-CoV EMC/2012	<i>Aglaiia</i> sp.	Silvestrol	1,3 µg/ml
MERS-CoV PLpro	<i>Broussonetia papyrifera</i> (L.) L'Hér. ex Vent.	Kazinol F	39,5±5,1 µg/ml
HCoV-229E	<i>Calophyllum blancoi</i> Planch. & Triana	Blankoksanton	3 µg/ml
HCoV-229E	<i>Bupleurum</i> sp.	Saikosaponin A, B2,C ve D	8,6±0,3 µg/ml
HCoV-229E	<i>Pelargonium sidoides</i> DC.	Tanımlanmamış	44,50±15,84 µg/ml
HCoV-OC43	<i>Stephania tetrandra</i> S.Moore	Tetrandrin	0,33±0,03 µg/ml
HCoV-NL63	<i>Sambucus formosana</i> Nakai	Tanımlanmamış	1,17±0,75 µg/ml

3-Kimotripsin benzeri proteaz (3CLpro) virüsün replikasyonu için hayati öneme sahiptir ve bu nedenle SARS-CoV ve ayrıca SARS-CoV-2 dahil olmak üzere diğer insan koronavirüslerinin terapötik ajanlarının geliştirilmesi için umut verici bir ilaç hedefini temsil eder. Geleneksel Çin Tıbbı'nda bitkisel ekstraktların SARS 3CLpro'nun enzimatik aktivitesini inhibe etme kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir: Çin Ravent özleri, *Houttuynia cordata* Thunb.'nin sulu ekstresi, *Litchi chinensis* Sonn. tohumlarından elde edilen flavonoid ve *Isatis tinctoria* L. köklerinden ekstre edilen betasitosterol. Ayrıca, sinigrin, indigo, aloe-emodin, hesperetin, kersetin, epigallokateşin gallat, gallokteşin gallat, herbasetin, roifolin ve pektoralinarin gibi bitki kaynaklı bileşiklerin SARS 3CLpro aktivitesini inhibe edebildiği gösterilmiştir. Flavonoidler, yani herbasetin, isobavaskalkon, kersetin 3-β-D-glukozit ve helikrisetin, MERS-CoV 3CL proteazının enzimatik aktivitesini bloke etme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir [30].

Helikaz proteini, anti-HCoV (insan koronavirüsü) ajanlarının gelişimi için potansiyel bir hedef

olarak kabul edilir. Skutellarein ve mirisetinin, ATPaz aktivitesini etkileyerek nsP13'ü (SARS-CoV helikaz proteini) *in vitro* olarak güçlü bir şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir. Hem pozitif hem de negatif iplikli RNA sentezinden sorumlu bir anahtar enzim olan RNA'ya bağlı RNA polimeraz (RdRp), başka bir potansiyel ilaç hedefini de temsil eder. *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehder & E.H.Wilson ve bazı mantar (*Coriolus versicolor* *Ganoderma lucidum*) özütlerinin SARS CoV RdRp'yi doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir [30].

Nicotiana benthamiana Domin'de bir anti-SARS-CoV monoklonal antikoru (mAb) CR3022 ve SARS-CoV-2'nin reseptör bağlanma alanını (RBD) üretme olasılığı araştırılmıştır. Sırasıyla 8 µg ve 130 µg taze bitki ekstresi mAb ve RBD'ye uygulanmıştır. Bitki ile saflaştırılmış mAb, SARS-CoV-2'ye bağlanır, ancak *in vitro* nötralize edemez. Bu, bitkilerde bir anti SARS-CoV mAb CR3022'nin fonksiyonel karakterizasyonunu gösteren ilk rapordur. Genel olarak bu bulgular, bitkilerin, salgın sırasında gelişmekte olan ekonomiler için özellikle önemli olan, araştırma reaktifi veya biyoterapötik olarak kullanılmak üzere anti-SARS-CoV mAb üretmek için umut verici bir platform olduğunu göstermiştir [31].

Klinik deneyler, klorokin SARS-CoV-2'nin kontrolünde ve tedavisinde etkili olduğunu kanıtlamıştır. Geleneksel Çin Tıbbı son SARS-CoV salgını boyunca Çin'de yaygın bir şekilde kullanılmış ve halen de kullanılmaktadır. Uygulanan en ünlü beş drog Astragali radix (Huangqi), Saposhnikoviae radix (Fangfeng), Glycyrrhizae radix et rhizoma (Gancio), Atractylodis macrocephalae rhizoma (Baizhu) ve Lonicerae japonicae flos'dur [32].

Tablo 6. Çin tıbbında Sars-CoV 2 tedavisinde kullanılan bitkiler [32]

Kullanılan Drog	Kullanımı
Forsythia fructus	Antipiretik- Detoks
Lonicerae japonica flos	
Rhizoma fagopyri cymosi	
Hoveniae dulcis semen	
Asteris radix et rhizoma	Antitüssif- Antiastmatik
Farfarae flos	
Eriobotrya folium	
Lepidii semen descurainiae semen	
Ardisiae japonicae herba	

Diğerleri

Virüs kaynaklı olarak daha birçok hastalıktan bahsetmek mümkündür. Bu hastalıkların tedavisinde ya da semptomların giderilmesinde geleneksel olarak kullanılan birçok tıbbi bitki vardır.

Bazı bitkiler etkilerini direkt virüs üzerinde gösterdiği gibi, bazı bitkiler ise etkilerini vücudun immün sistemini uyararak gösterirler.

Tablo 7. Bazı virüslere karşı kullanılan antiviral bitkiler [2]

Virüs	Bitki Adı ve Familyası
Adenovirüs	<i>Caesalpinia pulcherrima</i> (L.) Sw. (Fabaceae)
	<i>Camellia sinensis</i> (Theaceae)
	<i>Artemisia princeps</i> var. <i>orientalis</i> Hara (Asteraceae)
Poliovirüs	<i>Serissa japonica</i> (Thunb.) Thunb. (Rubiaceae)
	<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam. (Sterculiaceae)
	<i>Elytranthe globosa</i> (Roxb.) G.Don (Loranthaceae)
Veziküler Stomatit Virüsü	<i>Elytranthe maingayi</i> (Hook.f.) Tiegh.(Loranthaceae)
	<i>Piper aduncum</i> L. (Piperaceae)
	<i>Trichilia glabra</i> L. (Meliaceae)
Rinovirüs	<i>Echinacea angustifolia</i> DC. (Asteraceae)
Dang Virüsü	<i>Andrographis paniculata</i> (Acanthaceae)
	<i>Momordica charantia</i> L. (Cucurbitaceae)
	<i>Stemona tuberosa</i> Lour. (Stemonaceae)
Epstein-barr Virüs	<i>Camellia sinensis</i> (Theaceae)
	<i>Citrus hystrix</i> DC. (Rutaceae)
Enterovirüs	<i>Ocimum basilicum</i> L. (Lamiaceae)
	<i>Salvia miltiorrhiza</i> (Lamiaceae)
Sitomegalovirüs B1	<i>Bupleurum kaoi</i> Liu, C.Y.Chao & Chuang (Apiaceae)
Rotavirüs	<i>Astragalus membranaceus</i> (Fisch.) Bunge (Fabaceae)
Koksaki virüs	<i>Echinacea angustifolia</i> (Asteraceae)
Denovirüs	<i>Ocimum basilicum</i> (Lamiaceae)
Solunum Sinsityal Virüsü	<i>Blumea laciniata</i> (Wall. ex Roxb.) DC. (Asteraceae)
	<i>Laggera pterodonta</i> (DC.) Sch.Bip. ex Oliv. (Asteraceae)
	<i>Mussaenda pubescens</i> Dryand. (Rubiaceae)

SONUÇ VE TARTIŞMA

Derlemede en bilinen virüslere karşı kullanılan antiviral etkili bitkilerden bahsedilmiştir. Örnek olarak adenovirüse karşı *Camellia sinensis* L., SARS-CoV-2' ye karşı *Morus nigra* L., influenzaya karşı *Punica granatum* L., herpes simplex'e karşı *Ranunculus sceleratus* L. türleri verilebilir. Bu bilgiler ışığında bitkilerin birçok virüse karşı etkili olduğu görülmektedir.

Doğa güçlü antiviral etkiye sahip çok sayıda farklı bitki türü ile insanlığın virüsler karşısındaki

çaresizliğine derman olma potansiyeline sahiptir. Antiviral etkiye sahip bitkilerin taranması sırasında, halk tıbbında tıbbi etkileri ile bilinen bitkilere odaklanmak, değerli sonuçları en üst düzeye çıkarmak, zaman ve çaba tasarrufu sağlamak açısından büyük önem taşır. Farklı metotları ayırmak adına bitki ekstrelerinde mevcut etkili maddeleri belirlemek için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir [1].

Sonuç olarak, yeni antiviral ajanların geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu antivirallerin hücrel ve subseleler hedefleri için bir dizi epidemiyolojik ve hayvan modeli çalışması araştırılmış ve ümit verici sonuçlar gözlemlenmiştir. İnsan kullanımı için gerçek potansiyelinin araştırılması için hala çok fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Bu derleme, birçok bitki ekstresinin bu açıdan araştırılmaya değer olduğunu ortaya koymuştur [2].

YAZAR KATKILARI

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

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Waziri, Hoda M.A. (2015). Plants as antiviral agents. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 6, 2. [CrossRef]
2. Pushpa, R., Nishant, R., Navin, K., Pankaj, G. (2013). Antiviral potential of medicinal plants: an overview. *International Research Journal Pharmacy* 4(6), 8-16. [CrossRef]
3. Muhktar, M., Arshad, M., Ahmad, M., Pomerantz, J.R., Wigdahl, B., Parveen, Z. (2008). Antiviral potentials of medicinal plants. *Virus Research*, 131(2), 111-120. [CrossRef]
4. Abonyi, D.O., Adikwu, M.U., Esimone, C.O., Ibezim, E.C. (2009). Plants as sources of antiviral agents. *African Journal of Biotechnology*, 8(17), 3989-3994.
5. Akgül, Ö., Çalışkan, R., Öner, Y.A. (2018). HIV/AIDS güncel yaklaşımlar. *Tıp Fakültesi Klinikleri Dergisi*, 1(1), 19-31.
6. Chen, Z., Wang, N., Huang, Y., Wang, M. (2019). Clinical characteristics and cerebro-spinal fluid cytokine changes in patients with acquired immunodeficiency syndrome and central nervous

- system infection. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 18(1), 523-530. [CrossRef]
7. Jiang, Y., Feng, H., Lin, Y., Guo, X. (2016). New strategies against drug resistance to herpes simplex virus. *International Journal of Oral Science*, 8(1), 1-6. [CrossRef]
 8. Zhang, K., Lv, D., Li, R. (2019). Conserved herpesvirus protein kinases target samhd1 to facilitate virus replication. *Cell Reports*, 28(2), 449-459.e5. [CrossRef]
 9. Rooney, B.V., Crucian, B.E., Pierson, D.L., Laudenslager, M.L., Mehda, S.K. (2019). Herpes virus reactivation in astronauts during spaceflight and its application on earth. *Frontiers in Microbiology*, 10, 16. [CrossRef]
 10. Li, T., Peng, T. (2013). Traditional chinese herbal medicine as a source of molecules with antiviral activity. *Antiviral Research*, 97(1), 1-9. [CrossRef]
 11. Hoffmann, J., Gendrisch, F., Schempp, C.M., Wölflle, U. (2020). New herbal biomedicines for the topical treatment of dermatological disorders. *Biomedicines*, 8(2), 27. [CrossRef]
 12. Hassan, T.S. Sherif. (2020). Shedding light on the effect of natural anti-herpesvirus alkaloids on SARS-COV-2: a treatment option for COVID-19. *Viruses*, 12(4), 476. [CrossRef]
 13. Kaygusuz, S., Gül, S. (2018). Grip ve aşı. *Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 20(3), 329-344. [CrossRef]
 14. Krammer, F., Smith, G.J.D., Fouchier, R.A.M., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P.C., Palese, P., Shaw, M.L., Treanor, J., Webster, R.G., García-Sastre, A. (2018). Influenza. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 3. [CrossRef]
 15. Mehrbod, P., Ebrahimi, S.N., Fotouhi, F., Eskandari, F., Eloff, J.N., McGaw, L.J., Fasina, F.O. (2019). Experimental validation and computational modeling of anti-influenza effects of quercetin-3-o- α -l-rhamnopyranoside from indigenous south african medicinal plant *Rapanea Melanophloeos*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1),346. [CrossRef]
 16. Li, Y., Lai, C., Su, M., Cheng, J., Chang, Y. (2019). Antiviral activity of *Portulaca Oleracea L.* against influenza a viruses. *Journal of Ethnopharmacology*, 241, 112013 [CrossRef]
 17. Loader, M., Movarek, R., Witowski, S.E., Driscoll, L.M. (2019). A clinical review of viral hepatitis. *Journal of the Academy of PAs*, 32(11), 15-20. [CrossRef]
 18. Masood, U., John, S. (2020). Hepatitis D. *StatPearls Publishing LLC*.
 19. Yin, X., Feng, Z. (2019). Hepatitis E virus entry. *Viruses*, 11(10), 883. [CrossRef]
 20. Nishide, M., Ikeda, K., Mimura, H., Yoshida, M., Mitani, T., Koyama, A.H. (2019). Antiviral and virucidal activities against herpes simplex viruses of umeshu phenolics extracted from japanese apricot. *Microbiology ve Immunology*, 359-366. [CrossRef]
 21. Anbazhagan, G.K., Palaniyandi, S., Joseph, B. (2019). Antiviral plant extracts. *IntechOpen*. [CrossRef]
 22. Mani, J.S., Johnson, J.B., Steel, J.C., Broszczak, D.A., Neilsen, P.M., Walsh, K.B., Naiker, M. (2020). Natural product-derived phytochemicals as potential agents against coronaviruses: a review. *Virus Research*, 284, 197989. [CrossRef]

23. Fan, Y., Zhang, Y., Tariq, A., Jiang, X., Ahamd, Z., Zhihao, Z., Idrees, M., Azizullah, A., Adnan, M., Bussmann, R.W. (2020). Food as medicine: a possible preventive measure against coronavirus disease (COVID-19). *Phytotherapy Research*. [\[CrossRef\]](#)
24. Zhang, D., Wu, K., Zhang, X., Deng, S., Peng, B. (2020). *In silico* screening of chinese herbal medicines with the potential to directly inhibit 2019 novel coronavirus. *Journal of Integrative Medicine*, 18(2), 152-158. [\[CrossRef\]](#)
25. Orhan, I.E., Deniz, F.S.S. (2020). Natural products as potential leads against coronaviruses: could they be encouraging structural models against SARS-CoV-2 *Natural Products and Bioprospecting*, 10(4), 171-186. [\[CrossRef\]](#)
26. Cinati J., Morgenstern B., Bauer G., Chandra P., Rabenau H., Doer HW. (2003). Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *Lancet*; 361: 2045–46.
27. Yonesi, M., Rezazadeh, A. (2020). Plants as a prospective source of natural anti-viral compounds and oral vaccines against covid-19 coronavirus. *Preprints*, 2020, 2020040321 [\[CrossRef\]](#)
28. Vellingiri, B., Jayaramayya, K., Iyer, M., Narayanasamy, A., Govindasamy, V., Giridharan, B., Ganesan, S., Venugopal, A., Venkatesan, D., Ganesan, H., Rajagopalan, K., Rahman, P., Cho, S., Kumar, N.S., Subramaniam, M.D. (2020). COVID-19: a promising cure for the global panic. *Science of the Total Environment*, 725, 138277. [\[CrossRef\]](#)
29. Keyaerts, E., Vijgen, I., Pannecoque, C., Damme, E.V., Peumans, W., Egberink, H., Balzarini, J., Rast, V.N. (2007). Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle. *Antiviral Research*, 75(3), 179-187. [\[CrossRef\]](#)
30. Yang, Y., Islam, M., S., Wang, J., Li, Y., Chen, X. (2020). Traditional chinese medicine in the treatment of patients infected with 2019-new coronavirus (SARS-COV-2): a review and perspective. *International Journal of Biological Sciences*, 16(10), 1708-1717. [\[CrossRef\]](#)
31. Rattanapisit, K., Shanmugaraj, B., Manopwisedjaroen, S., Purwono, P., Siriwattananon, K., Khorattanakulchai, N., Hanittinan, O., Boonyayothin, W., Thitithanyanont, A., Smith, D., Phoolcharoen, W. (2020). Rapid and scalable production of functional anticoronavirus monoclonal antibody cr3022 in plants. *Research Square*. [\[CrossRef\]](#)
32. Barati, F., Poursmaieli, M., Ekrami, E., Asghari, S., Ziarani, F., R., Mamoudifard, M. (2020). Potential drugs and remedies for the treatment of COVID-19: a critical review. *Biological Procedures Online*, 22(15). [\[CrossRef\]](#)



ANTİPARKİNSON İLAÇLARINA VERİLEN BİREYSEL YANITTA FARMAKOGENETİĞİN ROLÜ

THE ROLE OF PHARMACOGENETICS IN INDIVIDUAL RESPONSE TO ANTIPARKINSONIAN DRUGS

Ahmet Hüsamettin BARAN^{1*} 

¹Sinop Üniversitesi, Durağan Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri Bölümü, 57200, Sinop,
Türkiye

ÖZ

Amaç: Alzheimer hastalığından sonra ikinci en yaygın nörodejeneratif bozukluk olan Parkinson hastalığı, tremor, rijidite, bradikinezi ve postural instabilite ile karakterize ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Çevresel ve genetik faktörler bu hastalığın patofizyolojisine katkıda bulunur. Dopaminin öncüsü olan L-DOPA, farmakoterapinin altın standardı olmaya devam etmektedir. Mevcut terapötik seçenekler klinik olarak faydalı olsa da parkinson hastalığı ilerleyici bir bozukluk olduğu için tedavisinde kullanılan tüm ilaçlarda zamanla etkinlik azalması ve yan etkilerde artış söz konusu olmaktadır.

Sonuç ve Tartışma: Son zamanlarda yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular antiparkinson ilaçlara yanıtın ve yan etkilerin bireyler arası önemli değişkenlikler gösterdiğini işaret etmektedir. Farmakogenetik, ilaç yanıtı ile ilişkili genetik belirteçleri tanımlamayı amaçlayan, hızla gelişen ve çok umut verici bir araştırma alanıdır. Farmakogenetik alanında gerçekleştirilen araştırmalar, bireylerarası genetik farklılıkların parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlara yanıtı önemli ölçüde belirlediğini göstermiştir. Bu alanda elde edilen / edilecek veriler antiparkinson tedavide değerli terapötik stratejiler sunma potansiyelinin yanında başarılı ilaç keşfi ihtimalini de artıracaktır. Bu derlemede antiparkinson tedaviye yanıtındaki değişkenliği daha iyi açıklamak ve parkinson hastalığının farmakoterapisini optimize etmek için genetik polimorfizmlerin rolünü tanımlamaya yönelik çalışmalar derlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Parkinson hastalığı, dopamin, farmakogenetik, polimorfizm

ABSTRACT

Objective: Parkinson's disease, the second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's, is a progressive neurodegenerative disease characterized by tremor, rigidity, bradikinesia and postural instability. Environmental and genetic factors contribute to the pathophysiology of this disease. The pioneer of dopamine, L-DOPA, remains the gold standard of pharmacotherapy. Although current therapeutic

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Ahmet Hüsamettin Baran
e-posta / e-mail: abaran@sinop.edu.tr, Tel. / Phone: + 905534514950

options are clinically beneficial, since parkinson's disease is a progressive disorder, all drugs used in treatment decline over time and increase in side effects.

Result and Discussion: *Recent studies have shown that responses to antiparkinsonian drugs and their side effects exhibit significant interpersonal variability. Pharmacogenetics is a rapidly evolving and very promising field of research aiming to identify genetic markers associated with drug response. Studies in pharmacogenetics have shown that interpersonal genetic differences largely determine the response to drugs used to treat parkinson's disease. Data obtained in this area will not only have the potential to present valuable therapeutic strategies for antiparkinson treatment, but also increase the probability of successful drug discovery. In this article, compiled studies to identify the role of genetic polymorphisms in better describing the variability in response to antiparkinson therapy and optimizing the pharmacotherapy of parkinson's disease.*

Keywords: *Parkinson's disease, dopamine, pharmacogenetics, polymorphism*

GİRİŞ

İngiliz doktor James Parkinson tarafından ilk kez 1817 yılında titrek felç anlamına gelen “shaking palsy” olarak tanımlanan [1] Parkinson hastalığı (PH), klinik tanıda tremor, rijidite, hipokinezi / bradikinezi ve postural instabilite gibi motor semptomlarla birlikte davranışsal, bilişsel bozukluklar ve otonomik semptomlar gibi motor olmayan semptomlarla karakterize, 65 yaş ve üzeri nüfusun %2-3'ünü etkileyen, alzheimer hastalığından sonra dünyada en yaygın ikinci ilerleyici nörodejeneratif hastalıktır [2]. Hareket bozukluğu olarak tanımlanan bu hastalığın etiyoloji ve patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır. Fakat PH'de meydana gelen hareket bozukluğunun büyük ölçüde orta beyinde bulunan ve çözünmeyen α -sinüklein agregatlarını içeren sitoplazmik inklüzyonlar olan Lewy cisimcikleri ile ilişkili substantia nigra pars compacta bölgesinde dopaminerjik nöronal hücre ölümü ve bunun sonucunda striatumda dopamin (DA) tükenmesi nedeniyle oluştuğu düşünülmektedir. Ayrıca genomik, epigenetik ve çevresel faktörlerle ilişkili patojenik mekanizmalar, mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres ile birlikte ubikuitin-proteazom sistemindeki anormallikler konformasyonel değişikliklere ve anahtar proteinlerin birikmesine yol açar [3]. DA seviyelerinde azalma, oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve protein homeostazında meydana gelen bozukluklar hastalık belirtilerini zaman içerisinde kötüleştirir [4]. PH'de semptomların ana nedeninin DA eksikliği olduğu göz önüne alındığında, striatumdaki DA'nın etkisini değiştirmek için tasarlanan dopaminerjik ilaçlar, şu anda PH tedavisinin temelini oluşturmaktadır. Bu amaçla DA'ya metabolize olan, DA reseptörünü aktive eden veya endojen DA'nın parçalanmasını önleyen ilaçlar kullanılmaktadır [5]. Şu an için motor semptomları kontrol altına alma ve semptomatik rahatlama sağlayan ilaçlar dışında hastalığın kesin tedavisi için bir ilaç yoktur [6]. Parkinson hastalığının güncel tedavisi için piyasada; 1960'larda tedaviye giren ve PH tedavisinde altın standart olarak kabul edilen levodopa (L-DOPA) ile DA agonistleri (ergot türevleri (bromokriptin, pergolid ve kabergolin), ergot olmayan DA agonistleri (pramipeksol, ropinirol, piribedil, apomorfin ve rotigotin)), katekol-O-metiltransferaz (KOMT) inhibitörleri (entakapon ve tolkapon), monoamin oksidaz-B (MAO-B) inhibitörleri (selegilin ve rasagilin), amantadin, antikolinergikler gibi çok sayıda ilaç mevcuttur [7]. Hastalar genellikle bu semptomatik farmakolojik tedaviden fayda görse de, hem etkinlik hem de yan etkiler açısından ilaç yanıtında büyük değişkenlik gösterirler [8-10].

Farmakogenetik çalışmalar, genetik faktörlerin bu ilaç yanıtı değişkenliğinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Farmakogenetik, ilaç yanıtının heterojenliğine katılan genetik faktörleri tanımlamayı amaçlayan, hızla gelişen ve tedavide çok umut verici bir araştırma alanıdır [11]. Farmakogenetik alanında gerçekleştirilen araştırmalar, bireylerarası genetik farklılıkların PH'nin tedavisinde kullanılan ilaçlara yanıtı önemli ölçüde belirlediğini göstermiştir [10]. Farmakogenetiğin hedefi, ilaçlı tedaviye yanıt verenleri ve yanıt vermeyenleri, ilaç yan etkileri açısından risk altındaki bireyleri tespit ederek ve dozu bireye göre ayarlayarak kişiselleştirilmiş tedavinin gerçekleştirilmesini sağlamaktır [12]. PH'nin farmakoterapisinde seçeneklerin sınırlı olması ve mevcut tedavilerin özellikle kronik kullanımına bağlı sınırlayıcı yan etkileri bilim insanlarını alternatif ilaçlar aramaya itmiştir. Bu kapsamda PH'nin farmakoterapisini optimize etmede genetik polimorfizmlerin rolünü tanımlamaya yönelik çalışmaların artması bu alanda yeni ilaç keşiflerine kapı aralayacak ve tedavi maliyetlerini önemli derecede düşürebilecektir.

Hastalığın Patogenezi

Dopaminerjik Yolak

PH patogenezinde en fazla bozulan nörotransmitter yolağı dopaminerjik yolaktır. PH beyinde DA nöronlarının ilerleyici kaybının, bazal gangliyonlarda dopaminerjik deafferentasyona yol açtığı, çok sistemli bir nörodejeneratif bozukluktur [13]. Polimorfik genler, DA sentezi, taşınması, bozulması ve sinyalleme kapasitesinde bireyler arası değişkenliğe yol açan çeşitli enzimleri, taşıyıcıları ve reseptörleri kodlar. DA, dopaminerjik nöronlarda dopa dekarboksilaz (DDK) enzimi tarafından tirozinden L-DOPA'ya dönüştürülür. Daha sonra veziküler monoamin taşıyıcı 2 (SLC18A2) yoluyla sinaptik veziküllere taşınır. DA, sinaptik vezikül 2C (SV2C) proteinleriyle birlikte ekzositoz ile sinaptik aralığa salınır. Daha sonra sinyal postsinaptik nöronlara veya glial hücrelere DA reseptörleri (DRD1-5) aracılığıyla iletilir. DA'nın presinaptik nörona geri alımı, DA taşıyıcısı (SLC6A3) aracılığıyla gerçekleşir, burada gelecekte salınmak üzere veziküller halinde yeniden paketlenir veya MAO-B ve KOMT enzimleri tarafından metabolize edilir [14]. Substantia nigra'da dopaminerjik nöronların kaybına neden olan ve PH'nin motor semptomlarından sorumlu moleküler mekanizmalar hala tam olarak anlaşılammış olsa da bu süreçte rol alan genlere ait mutasyonların PH patogenezinde dopaminerjik yolağı etkilemede önemli yer tuttuğu artık bilinen bir gerçektir.

Nöropatolojik Mekanizmalar

PH'nin nöropatolojik mekanizması oldukça karmaşıktır. Bilim insanları tarafından en çok kabul gören hipotez, PH'nin patolojik olarak ayırt edici özelliği substantia nigra pars compacta bölgesindeki dopaminerjik nöron kaybı ve lewy cisimcikleri veya lewy nöritleri olarak isimlendirilen α -sinüklein kümelenmelerinden oluşan filamentli, sitoplazmik inklüzyonların birikmesidir. α -sinüklein fosforilasyonu ve fibrilasyonu, lewy cisimcikleri oluşumuna yol açtığı, bunun da nöron ölümünü indüklediği düşünülmektedir [4, 15, 16]. Ayrıca dopaminerjik nöron ölümü oksidatif stres ve

mitokondriyal disfonksiyon ile de ilişkilendirilmektedir. PH'de nöronal oksidatif dengenin bozulması, aynı zamanda hücrel homeostazın ana düzenleyicilerinden ve normal şartlarda hücre içi reaktif oksijen türlerinin ana kaynağı olan mitokondri hasarının nörodejenerasyona katkıda bulunduğu düşünülmektedir [17, 18]. DA dışında, serotonin (5-HT) özellikle tremor, biliş, depresyon ve psikoz dahil olmak üzere çeşitli motor ve motor olmayan semptomlarda ve ayrıca L-DOPA'nın neden olduğu diskinezide önemli bir rol oynar [19].

Son yıllarda yapılan araştırmalar çeşitli proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlara bağlı anormalliklerin de substantia nigra'daki dopaminerjik nöronların ölümünde rol aldığını göstermiştir. Örneğin PH tedavisinde potansiyel terapötik hedefler bulmak için yapılan bir çalışmada bir fosfoinositid fosfataz proteini olan Sinaptojanin (SYNJ1) mutasyonu erken başlangıçlı atipik Parkinsonizmi üç ailede nedensel gen olarak tanımlanmıştır [20]. Son araştırmalar, PH'nin nöropatolojisine ait bilgilerimizi artırsa da, PH'nin patogenezindeki birçok faktör ve nöronal hücre ölümünün nedenleri hala tam olarak anlaşılamamıştır.

Mevcut Tedaviler

Nöropatolojik mekanizmaları tam olarak anlaşılamadığından, günümüzde PH için etkili bir nöroprotektif tedavi de mevcut değildir. En etkili semptomatik tedavi dopaminerjik ilaçlar (L-DOPA, DA agonistleri ve DA metabolizmasını inhibe eden diğer dopaminerjik ilaçlar) ile gerçekleştirilebilmektedir [21]. DA sindirim mukozasını veya kan beyin bariyeri (KBB)'ni geçemediğinden, oral yoldan verilebilen bir ilaç olarak DA öncüsü L-DOPA geliştirilmiştir. L-DOPA'nın önemli bir kısmı bağırsaklarda aromatik L-aminoasit dekarboksilaz enzimi tarafından DA'ya dönüştürüldüğünden ancak %30 kadarı kan dolaşımına geçebilmektedir. Bu nedenle L-DOPA genellikle karbidopa (L-DOPA/karbidopa doz oranı 10/1 veya 4/1 şeklinde) ve benserazid (L-DOPA/karbidopa doz oranı 4/1 şeklinde) gibi DDK inhibitörleriyle kombine halde kullanılmaktadır. DDK inhibitörlerinin kullanımı L-DOPA'nın oral biyoyararlanımını yaklaşık üç katına çıkarır. Aynı zamanda kombine tedavi gastrointestinal ve kardiyovasküler yan etkileri de önemli ölçüde azaltır [22]. 1960'larda kullanıma giren L-DOPA, günümüzde hala PH'de motor semptomların farmakolojik tedavisi için DA replasman farmakoterapisinin altın standardı olmaya devam etmektedir. Bununla beraber L-DOPA yalnızca motor semptomlarda hafifleme sağlar. PH'nin kronik bir hastalık olması dolayısıyla gerçekleştirilen uzun süreli tedavi, L-DOPA tedavisinin etkinliğini sınırlayan, doz ayarlaması gerektiren ve hastaların yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen diskinezi, *wearing off* (doz sonu kötüleşme) ve *on-off* fenomenleri gibi ciddi motor komplikasyonların gelişimine neden olabilir [23-25].

DA agonistleri ve DA metabolizmasını inhibe eden diğer dopaminerjik ilaçlar L-DOPA'ya kıyasla hastalar tarafından daha az tolere edilir ve daha az etkilidirler. DA agonistleri, DA'yı taklit eder ve striatumdaki bozulmamış postsinaptik DA reseptörlerini doğrudan uyarırlar. Ergot türevleri (bromokriptin, pergolid ve kabergolin) ve ergot olmayan (pramipeksol, ropinirol, piribedil, apomorfin

ve rotigotin) ilaçlar olmak üzere iki grup DA agonisti geliştirilmiştir. PH'nin semptomlarını kontrol etmede L-DOPA kadar etkili olmasalar da, L-DOPA tedavisine ihtiyacı erteleme veya bu semptomları kontrol etmek için gerekli L-DOPA dozunu azaltmada ve L-DOPA ile ilişkili yan etkilerin başlamasını geciktirmede yardımcı olabilirler. Bu amaçla tedavide monoterapi olarak veya L-DOPA tedavisine ek olarak kullanılırlar. DA agonistlerinin yan etkileri halüsinasyonlar, gündüz aşırı uyku hali, hiperseksüalite, kompulsif kumar oynama, kompulsif alışveriş ve kompulsif yeme gibi dürtü kontrol bozukluklarıdır [26, 27]. PH semptomlarını tedavi etmede L-DOPA'dan sonra en güçlü ilaç grubudur. L-DOPA'ya nispeten daha az motor komplikasyonlara neden olmaları ve diskinezi ve motor dalgalanmalar gibi motor komplikasyonların gelişimini geciktirmeleri dolayısıyla tercih edilirler [28].

KOMT inhibitörleri (entakapon ve tolkapon) , periferde (entakapon, tolkapon) ve beyinde (tolkapon) L-DOPA'nın 3-O-metil-dopa'ya metabolizmasını katalize eden KOMT enzimini inhibe eder. KOMT enziminin inhibisyonu daha fazla L-DOPA dozunun beyne ulaşmasını sağlar. Dolayısıyla KOMT inhibitörleri L-DOPA ile beraber kullanılmalıdır. Tolkapon ve entakaponun, L-DOPA'nın biyoyararlanımını arttırdığı ve yarı ömrünü uzattığı, ancak maksimum doza veya maksimum plazma konsantrasyonuna (Cmax) ulaşma süresini artırmadığı gösterilmiştir. Bu ilaçlar FDA tarafından L-DOPA tedavisine bağlı *wearing off* fenomeni gibi motor dalgalanmaları olan hastalar için onaylanmıştır. En önemli yan etkisi hepatotoksisite olan tolkaponun kullanımı bu sebeple gerçekleşen ölümlerden dolayı FDA tarafından kısıtlanmıştır. Entakapon daha yaygın kullanılır, hepatotoksisite riski daha azdır. Fakat yarı ömrü daha kısadır ve daha az etkilidir [3, 29].

MAO-B inhibitörleri (selegilin ve rasagilin) beyindeki DA'nın MAO-B tarafından yıkımını engelleyerek sinaptik aralıktaki DA seviyelerini ve böylece DA'nın etkisini arttırırlar. MAO-B inhibitörlerinin antiparkinson etkisi L-DOPA ve DA agonistlerine göre daha düşüktür ve parkinsonizm bulguları hafif olan hastalarda hastalığın erken evrelerinde monoterapi olarak ya da motor dalgalanmaları azaltmak ve etki süresini uzatmak amacıyla L-DOPA'ya ek olarak kullanılırlar. Rasajilin, ilk onaylanan MAO-B inhibitörü selejiline nispeten daha güçlüdür, fakat selejiline göre yan etkileri daha fazladır. Yan etkileri arasında dopaminerjik (bulantı, hipotansiyon, diskinezide artış gibi) yan etkiler ve amfetamin metabolitine bağlı (insomni, ajitasyon gibi) çeşitli yan etkileri vardır [26, 29, 30].

Başlangıçta bir antiviral ilaç olarak kullanılan amantadinin anti-parkinson etkileri 1969 yılında tanımlanmıştır. Amantadin antikolinergik özellikleri, presinaptik DA salınımını artırması ve sinaptik aralıktan DA geri alımını engellemesinden dolayı PH'ının tedavisinde monoterapi olarak veya L-DOPA ile kombine tedavide kullanılır. Hastalığın ileri evrelerinde L-DOPA kaynaklı diskinezileri azaltan anti-diskinetik etkilere sahiptir [29]. Aynı zamanda bazı çalışmalar amantadinin bazal gangliyonlarda eksitotoksisiteye aracılık eden N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerini bloke etme yeteneği ile potansiyel bir nöroprotektif ajan olabileceğini göstermiştir. PH'de hafif semptomatik düzelme sağlar.

Yaygın yan etkileri arasında dizlerin etrafında oluşan livedo retikularis, görsel halüsinasyonlar, konfüzyon ve ayak bileğinde ödem sayılabilir [31].

Antikolinerjikler, asetilkolin aktivitesi ve striatal DA arasındaki dengesizliği düzelterek etkilerini gösterirler. Antikolinerjik ajanlarla PH'ye bağlı tremor tedavisinde dikkate değer farmakoterapötik faydalar elde edilebilir. En yaygın kullanılan antikolinerjik ajanlar triheksifenidil, benztropin ve prosiklidindir. Günümüzde bu ilaçlar, ciddi merkezi ve periferik yan etkileri nedeniyle genellikle dopaminerjik ajanlara dirençli tremorda tercih edilirler ve özellikle yaşlı hastalarda kullanımları sınırlıdır [26]. Santral (unutkanlık, psikoz ve mental işlevlerde yavaşlama) ve periferik (ağız kuruması, üriner retansiyon, taşikardi, konstipasyon ve akomodasyon güçlüğü) yan etkileri mevcuttur. Güncel tedavide kullanılan ilaçlara ait sınıflandırma tablo 1'de yer almaktadır [26, 29, 32-35].

Farmakogenetik

PH'nin tedavisinde kullanılan mevcut ajanların hastalığın ilerlemesine engel olmaması nedeniyle anti-parkinson ilaçların faydalı etkileri zamanla azalır ve ciddi motor komplikasyonlar ve diğer yan etkiler tedavinin önünde önemli engeller teşkil eder [36]. Diğer taraftan ilaca yanıt ve yan etkiler bireylerarası büyük değişiklikler gösterir. Bununla beraber bazı hastalar beklenen terapötik faydayı göremezler [37]. Bu da "herkese uyan tek beden" yaklaşımının PH'nin tedavisinde doğru olmadığını gösterir. Bu kapsamda hastaların genetik profilinin ilaç yanıtı üzerindeki etkileri uzun yıllardır araştırılmaktadır ve bu nedenle farmakogenetik bireye özgü tedavi protokollerinin oluşturulmasında oldukça önemlidir. Farmakogenetik, ilaç yanıtıyla ilişkili genetik belirteçleri tanımlamayı amaçlayan, hızla gelişen ve çok umut verici bir araştırma alanıdır. Teorik olarak, klinik uygulamada farmakogenetik, etkililik ve toksisite ile ilgili olarak bir bireyin ilaç yanıtını tahmin etmemizi sağlayacak bilgiler verebilir [11].

PH'nin tedavisinde farmakogenetik çalışmalar çoğunlukla ilaç metabolize eden enzimleri (KOMT ve MAO-B) kodlayan genlerdeki, DA reseptörlerindeki (DRD1-5) ve taşıyıcı proteinlerdeki genetik polimorfizmlere yoğunlaşmıştır. Bu genetik polimorfizmlerin ilaca bireysel yanıtı değiştirmelerinin yanında hastalıkla ilişkili olabileceğini gösteren kanıtlar da vardır [38, 39].

Farmakodinamik Polimorfizmler

DA Reseptörleri

Dopaminerjik reseptörleri kodlayan genlerdeki polimorfizmler, ilaca bireysel yanıtta ve çeşitli yan etkilerde önemli rol oynamaktadır. Örneğin; PH'de tek başına veya L-DOPA ile beraber kullanılan ve ergot türevi olmayan DA agonisti pramipeksolün etkinliği üzerindeki DRD2 TaqIA ve DRD3 Ser9Gly gen polimorfizmlerinin etkisini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, terapötik cevapta ve advers ilaç reaksiyonlarında bireyler arası önemli farklılıklar olduğu tespit

edilmiştir. Bu durum DA reseptörünü kodlayan DRD3 Ser9Gly polimorfizminin ilaç yanıtında bireylerarası değişkenliği belirlemede önemli bir faktör olmasıyla açıklanmıştır [27].

Tablo 1. PH tedavisinde kullanılan ilaçların sınıflandırılması.

Sınıf	İlaç	Dozaj	Yan etki
DA prekürsörü	L-DOPA	levodopa/karbidopa/entakapon, levodopa/karbidopa, levodopa/benserazid kombinasyonları halinde çok çeşitli dozlarda uygulanır.	Diskinezi, <i>wearing off</i> (doz sonu kötüleşme), <i>on-off</i> (iyi ve kötü)
Periferik aromatik l-aminoasit dekarboksilaz enzim (AAAD) inhibitörleri	Karbidopa		
	Benserazid		
Antikolinergikler	Triheksifenidil	Günde üç kez ağızdan 2 mg ile başlatılır ve günde üç kez maksimum 5 mg'a kadar yükseltilir.	-Santral yan etkiler; unutkanlık, psikoz ve mental işlevlerde yavaşlama -Periferik yan etkiler; ağız kuruması, üriner retansiyon, taşikardi, konstipasyon ve akomodasyon güçlüğü
	Benzotropin	Günde iki defa 0,5 mg ile başlatılır, günde maksimum 3 ila 4 mg'a kadar her üç ila dört günde bir 0,5 ila 1,0 mg artırılır.	
	Prosiklidin	-	
N-metil-D-aspartat (NMDA) antagonisti + artmış DA salınımı + azaltılmış geri alım	Amantadin	Amantadin genellikle 100 mg/gün ile başlatılır ve gerektiğinde 300 mg/gün'e yükseltilir. En yüksek günlük doz 400 mg'dır. Böbrek yetmezliği olan hastalarda doz ayarlaması gerekecektir.	Dizlerin etrafında oluşan livedo retikularis, görsel halüsinasyonlar, konfüzyon, ayak bileğinde ödem, antikolinergik yan etkiler
DA agonistleri	Ergot türevi DA agonistleri; bromokriptin, pergolid ve kabergolin	-Parlodel tedaviye ilk hafta boyunca tercihen akşamları alınacak 1.25 mg gibi düşük bir dozla başlanır. Günlük doz artışı her bir haftada, günlük 1.25 mg eklenecek şekilde kademeli olarak yapılmalıdır. Günlük doz 2 ya da 3 kerededir verilmelidir. -Kabergolin günde tek doz 1 mg başlanır. Gerekirse haftalık ya da iki haftalık aralarla 0,5-1 mg artırılabilir.	Halüsinasyonlar, gündüz aşırı uyku hali, hiperseksüalite, kompulsif kumar oynama, kompulsif alışveriş ve kompulsif yeme gibi dürtü kontrol bozuklukları
	Ergot olmayan DA agonistleri; pramipeksol, ropinirol, piribedil, apomorf in ve rotigotin	-Pramipeksol 0.125 mg, 0.25 mg, 0.5 mg, 0.75 mg, 1 mg, 1.5 mg formlarında mevcuttur ve günde üç kez uygulanmak üzere 1.5-4.5 mg/gün hedef aralığına kademeli olarak titre edilir. -Ropinirol günde üç kez 0.25, 0.5, 1, 2 ve 5 mg'da dozlanır. Başlangıç titrasyonunu takiben haftalık 3 mg/gün'e kadar artış yapılabilir. Doz yükseltme titrasyonu da ilk ayda günde en fazla 8 mg'a ulaşana kadar haftalık olarak yapılır. Tipik günlük doz 8 ila 24 mg'dır. 24 mg/gün'ün üzerindeki dozların güvenilirliği ve etkinliği tespit edilmemiştir ve bu doz aşılmalıdır. -Rotigotin 1, 2, 3, 4, 6 ve 8 mg dozlarında 24 saatte 1 flaster uygulanır.	
MAO-B inhibitörleri	Selejilin	Günde 5 ila 10 mg dozda oral olarak verilir.	-Dopaminerjik (bulantı, hipotansiyon, diskinezide artış gibi) yan etkiler -Amfetamin metabolitine bağlı (insomni, ajitasyon gibi) yan etkiler
	Rasajilin	Rasajilin Günde 1 mg dozda oral olarak verilir.	
	Safinamid	-	
KOMT inhibitörleri	Entakapon	200 mg'lık tabletlerde mevcuttur. Her bir levodopa dozu ile birlikte bir tablet verilir, toplam günlük doz 2000 mg'ı geçmez.	Somnolans, dürtü kontrol bozuklukları, diyare, ortostatik hipotansiyon
	Tolkapon	Günde üç kez 100 mg'da başlatılır ve gerekirse günde üç kez 200 mg'a çıkarılır.	Hepatotoksisite

PH'nin tedavi sürecinde ortaya çıkabilecek patolojik kumar oynama, aşırı yeme, aşırı cinsellik ve aşırı alışveriş gibi dürtüsel davranışlar ile KOMT ve DRD2 polimorfizmleri arasında ilişki olduğu gösterilmiştir [40]. L-DOPA ile tedavi edilen hastalarda diskinezi insidansına ilişkin beş yıllık prospektif, çift kör randomize kontrollü bir çalışmada L-DOPA ile tedavi edilen hastaların yaklaşık %45'inde, ropinirol tedavisi alan hastaların ise %20'sinde beş yıl içinde diskinezi ortaya çıktığı görülmüştür [41]. DA reseptör genleri ile L-DOPA tedavisi kaynaklı diskinezi ilişkilidir [42]. Diskinezilerin ortaya çıkmasındaki rolünün yanı sıra DA reseptörlerinin polimorfizmleri, PH hastalarında halüsinasyonlara da neden olabilir. Örneğin; Liu ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada DRD2 ve DRD3 polimorfizmleri ile görsel halüsinasyonlar arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir [43].

Taşıyıcı Proteinler

Taşıyıcı proteinler, çok çeşitli bileşiklerin absorpsiyonunda, dağılımında ve eliminasyonunda önemli bir role sahiptir. Organik katyon taşıyıcılar (OCT), hem DA gibi endojen bileşiklerin hem de bazı anti-parkinson ilaçların taşınmasında rol oynar. OCT ailesinin en önemli üç üyesi sırasıyla SLC22A1, SLC22A2 ve SLC22A3 genleri tarafından kodlanan OCT1, OCT2 ve OCT3'tür. Pramipeksol ve amantadin, OCT1 ve OCT2 için substratlardır. L-DOPA, alt tipi henüz tanımlanmamış olmasına rağmen, OCT için bir substrattır. Dopaminerjik ilaçların KBB üzerinden santral sinir sistemine taşınmasında görevli taşıyıcıları da ilaç yanıtını potansiyel olarak değiştirebilir. Bir çalışma, organik katyon taşıyıcı 1 geninin (OCT1) polimorfizmi ile anti-parkinson ilaçların dozları arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir [44].

L-DOPA, PH motor semptomlarının birinci basamak tedavisidir ancak doz yanıtı oldukça değişkendir. PH'nin altın standart tedavisi olarak DA öncüsü L-DOPA, bir amino asit taşıyıcısı olan SLC7A5 tarafından KBB'den taşınır ve dopaminerjik nöronlarda DA'ya dönüştürülür. DDK ve KOMT tarafından periferik dokularda da metabolize edilebilir. İlacın taşınması, dağıtılması ve ortamdan uzaklaştırılması, taşıyıcı SLC22A1 tarafından kolaylaştırılır. Bu genlerin tek nükleotid polimorfizmleri (TNP) ile dopaminerjik tedaviye yanıt arasındaki ilişkilerini araştıran birkaç farmakogenomik çalışma yapılmıştır. Örneğin bir çalışmada, SLC22A1 ve SV2C'nin TNP'lerinin L-DOPA dozunu etkilediği gösterilmiştir [45].

PH uzun süreli tedavisinde, özellikle ileri bilişsel bozuklukların mevcut olduğu parkinson hastalarında daha sık olmak üzere, tedavi sürecinde hastaların %40'ından fazlasında görülen motor olmayan komplikasyonlardan biri görsel halüsinasyonlardır [46]. Dopamin taşıyıcı (DAT) genindeki polimorfizmler, PH olan görsel halüsinasyonlar ve L-DOPA dozu arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. DAT genindeki polimorfizmler, sinaptik aralıkta DA'nın geri alımını etkileyebilir. En az bir yıl süreyle 200 mg L-DOPA ile tedavi edilen 196 PH olan hastada gerçekleştirilen bir çalışmada hastaların yaklaşık %26'sında görsel halüsinasyonlar tespit edilmiştir. Görsel halüsinasyonları olan

hastalarda PH'nin motor semptomlarının başlama yaşı daha düşük ve hastalığın şiddetinin daha fazla olduğu görülmüştür [47].

DAT geninin 40-bp VNTR (rs28363170) ve rs393795 (A/C) polimorfizmlerinin L-DOPA kaynaklı diskinezi (LID) geliştirme riski ile ilişkili olup olmadığını 181 İtalyan PH hastasının iyi karakterize edilmiş bir kohortunda araştırmayı amaçlayan bir çalışmada, iki DAT gen polimorfizminin taşıyıcıları arasında diskinezi prevalansında bir fark olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte, DAT geninin 10R/10R (rs28363170) ve A taşıyıcısının (rs393795) iki genotipinin kombinasyonu, bunları taşımayan PH deneklere göre L-DOPA ile uzun süreli tedavi sırasında LID oluşma riskini azalttığı tespit edilmiştir [48].

KOMT ve MAO-B

L-DOPA ile tedavide MAO-B ve KOMT enzimlerinde genetik polimorfizmin etkisini değerlendirmek ve MAO-B ve KOMT haplotipleri ile PH'da kullanılan mevcut ilaçlarla ortaya çıkan motor komplikasyonlar arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmak üzere Białecka ve ark. tarafından bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, Polonya kökenli toplam 95 hasta (40 kadın ve 55 erkek) çalışmaya dâhil edilmiş ve hastalar, tedavinin ilk 5 yılında günde 500 mg'dan düşük ve tedavinin ilk 5 yılında günde 500 mg'dan yüksek L-DOPA dozları ile tedavi edilen olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Çalışmanın sonucunda, KOMT^{LL} genotipi ve MAO-B genotip A'sı olan hastaların daha etkili ve daha güvenli L-DOPA tedavisinden fayda görebileceği tespit edilmiştir [49]. Benzer bir çalışmada da MAO-B (rs1799836) ve KOMT (rs4680) genlerindeki TNP'leri ile L-DOPA'ya verilen terapötik yanıt ve yan etkilerin gelişimi arasında bireysel farklılıkların olduğu gösterilmiştir [50].

Parkinson hastalığında dopaminerjik tedavinin motor ve motor olmayan yan etkilerinin ortaya çıkmasında anahtar dopaminerjik yol genlerinin seçilmiş TNP'lerinin etkisinin kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi amacıyla 231 parkinson hastasıyla gerçekleştirilen bir çalışmanın sonuçlarına göre, KOMT rs165815 C alelinin görsel halüsinasyonlar geliştirme olasılığı daha düşükken, en az bir DRD3 rs6280 C aleli ve CC homozigot taşıyıcılarının bu olumsuz olay için daha yüksek olasılıkları olduğu görülmüştür. En az bir DDC rs921451 C aleli ve CT heterozigot taşıyıcılarını, ortostatik hipotansiyon için daha yüksek riske sahip oldukları tespit edilmiştir. DDC rs3837091 ve SLC22A1 için heterozigotlar rs628031 AA taşıyıcıları ayrıca ortostatik hipotansiyon için daha yüksek oranlara sahip olduğu ve SLC22A1 rs628031 AA genotipinin taşıyıcıları, periferik ödem ve dürtü kontrol bozuklukları için daha yüksek oranlara sahipti. Son olarak, SLC22A1 rs628031 için heterozigotlar ve en az bir SLC22A1 rs628031 A alelinin taşıyıcıları, diskinezi için daha düşük olasılıklara sahipti [14].

Buraya kadar verilen literatürlerden örnekler içeren, Anti-PH ilaçlara verilen yanıtları belirleyen gen polimorfizmlerinden bazıları Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Anti-PH ilaçlarına verilen bireysel yanıtların altında yatan bazı polimorfizmler ve genomik varyantlar.

Gen	Polimorfizm/Genotip	Etki
DRD2	TaqIA	Geç başlangıçlı halüsinasyonlar
DRD3	Ser9Gly	<i>wearing off</i> 'un tetiklenmesi
	rs6280 C aleli	Görsel halüsinasyonlar için artmış risk
SLC22A1	A/C	L-DOPA'ya kötü yanıt
	rs628031 AA	Periferik ödem ve dürtü kontrol bozuklukları için artmış risk, diskinezi olasılığı daha düşük
DAT	VNTR (40 bp)	Görsel halüsinasyonlara ve psikoza yatkınlık yaratır
	10R/10R	LID oluşma riskinde azalma
KOMT	LL	L-DOPA'ya iyi yanıt, şiddetli diskinezi
DDC	rs921451 C	Ortostatik hipotansiyon yan etkisi açısından artmış risk

SONUÇ ve TARTIŞMA

Farmakogenetiğin hedefi, ilaçlı tedaviye yanıt verenleri ve yanıt vermeyenleri önceden tespit ederek, tedavi dozunu ayarlayarak ve advers ilaç reaksiyonları açısından yüksek risk altındaki bireyleri belirleyerek tedaviyi bireye göre kişiselleştirmektir. Her ne kadar bu hedefe henüz ulaşılamamış olsa da moleküler genetikteki son gelişmeler, farmakogenetiğin klinik uygulamaya aktarılmasının yolunu açmıştır. PH onlarca yıldır süren çalışmalara rağmen, dünyada prevalansı hızla artan, ciddi fiziksel ve mali yükler oluşturmaya devam eden bir hastalıktır. PH'nın güncel tedavisinde kullanılan ajanların hastalığın ilerlemesini yavaşlatmadığı veya durduramadığı sadece semptomatik rahatlama sağladığı artık bilinen bir gerçektir. Bu da etkili tedavilere acil ihtiyacın olduğunu açıkça göstermektedir. PH'nın farmakoterapisini optimize etmede genetik polimorfizmlerin rolünü tanımlamaya yönelik çalışmalar, hastalık hakkında deneyimlerimizin artması ve genetik bilimindeki gelişmelerin katkısıyla oldukça hızlanmıştır. Yapılan çalışmalar PH'da dopaminerjik tedaviye yanıtın, birçok klinik ve genetik faktöre bağlı olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla, her hastanın genetik heterojenliği bilgisi, minimum yan etkilerle optimum etkiyi elde etmek için en uygun bireysel tedavi planının tasarlanmasına ve kullanılan dozların bireysel olarak ayarlanmasına önemli ölçüde katkıda bulunabilir. Bu amaçla büyük hasta gruplarında kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu alanda elde edilen/edilecek veriler antiparkinson tedavide değerli terapötik stratejiler sunma potansiyelinin yanında başarılı ilaç keşfi ihtimalini de artıracaktır.

YAZAR KATKILARI

Kavram: A.H.B.; Tasarım: A.H.B.; Denetim: A.H.B.; Kaynaklar: -; Malzemeler: -; Veri toplama ve/veya işleme: -; Analiz ve/veya yorumlama: A.H.B.; Literatür taraması: A.H.B.; Makalenin yazılması: A.H.B.; Kritik inceleme: A.H.B.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. 1817. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 14(2), 223-236; discussion 222. [\[CrossRef\]](#)
2. Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C.M., Halliday, G.M., Brundin, P., Volkmann, J., Schrag, A.E., Lang, A.E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17013. [\[CrossRef\]](#)
3. Cacabelos, R. (2017). Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 551-578. [\[CrossRef\]](#)
4. Raza, C., Anjum, R., Shakeel, N.U.A. (2019). Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sciences*, 226, 77-90. [\[CrossRef\]](#)
5. Balestrino, R., Schapira, A.H.V. (2020). Parkinson disease. *European Journal of Neurology*, 27(1), 27-42. [\[CrossRef\]](#)
6. Zesiewicz, T.A. (2019). Parkinson disease. *Continuum (Minneapolis, Minn)*, 25(4), 896-918. [\[CrossRef\]](#)
7. Paul, A., Yadav, K.S. (2020). Parkinson's disease: Current drug therapy and unraveling the prospects of nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 58, 101790. [\[CrossRef\]](#)
8. Kurzawski, M., Białocka, M., Drożdżik, M. (2015). Pharmacogenetic considerations in the treatment of Parkinson's disease. *Neurodegenerative Disease Management*, 5(1), 27-35. [\[CrossRef\]](#)
9. Damasceno Dos Santos, E.U., Duarte, E.B.C., Miranda, L.M.R., Asano, A.G.C., Asano, N.M.J., Maia, M.M.D., de Souza, P.R.E.. (2019). Pharmacogenetic profile and the occurrence of visual hallucinations in patients with sporadic Parkinson's disease. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 59(7), 1006-1013. [\[CrossRef\]](#)
10. Redenšek, S., Jenko Bizjan, B., Trošt, M., Dolžan, V. (2020). Clinical and clinical-pharmacogenetic models for prediction of the most common psychiatric complications due to dopaminergic treatment in Parkinson's disease. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 23(8), 496-504. [\[CrossRef\]](#)
11. Shah, R.R., Shah, D.R. (2012). Personalized medicine: Is it a pharmacogenetic mirage? *British Journal of Clinical Pharmacology*, 74(4), 698-721. [\[CrossRef\]](#)
12. Spear, B.B., Heath-Chiozzi, M., Huff, J. (2001). Clinical application of pharmacogenetics. *Trends in Molecular Medicine*, 7(5), 201-4. [\[CrossRef\]](#)

13. Alexander, G.E. (2004). Biology of Parkinson's disease: Pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 6(3), 259-280. [\[CrossRef\]](#)
14. Redenšek, S., Flisar, D., Kojović, M., Gregorič Kramberger, M., Georgiev, D., Pirtošek, Z., Trošt, M., Dolžan, V. (2019). Dopaminergic pathway genes influence adverse events related to dopaminergic treatment in Parkinson's disease. *Frontiers in Pharmacology*, 10(8). [\[CrossRef\]](#)
15. Dauer, W., Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: Mechanisms and models. *Neuron*, 39(6), 889-909. [\[CrossRef\]](#)
16. Simon, D.K., Tanner, C.M., Brundin, P. (2020). Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics, and pathophysiology. *Clinics in Geriatric Medicine*, 36(1), 1-12. [\[CrossRef\]](#)
17. Trist, B.G., Hare, D.J., Double, K.L. (2019). Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell*, 18(6), e13031. [\[CrossRef\]](#)
18. Puspita, L., Chung, S.Y., Shim, J.W. (2017). Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease. *Molecular Brain*, 10(1), 53-53. [\[CrossRef\]](#)
19. Huot, P., V. Sgambato-Faure, S.H. Fox, A.C. McCreary. (2017). Serotonergic approaches in Parkinson's disease: Translational perspectives, an update. *ACS Chemical Neuroscience*, 8(5), 973-986. [\[CrossRef\]](#)
20. Drouet, V., Lesage, S. (2014). Synaptojanin 1 mutation in Parkinson's disease brings further insight into the neuropathological mechanisms. *BioMed Research International*, 289728-289728. [\[CrossRef\]](#)
21. Dietrichs, E., Odin, P. (2017). Algorithms for the treatment of motor problems in Parkinson's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, 136(5), 378-385. [\[CrossRef\]](#)
22. Kalinderi, K., Fidani, L., Katsarou, Z., Bostantjopoulou, S. (2011). Pharmacological treatment and the prospect of pharmacogenetics in Parkinson's disease. *International Journal of Clinical Practice*, 65(12), 1289-94. [\[CrossRef\]](#)
23. Tirozzi, A., Modugno, N., Palomba, N.P., Ferese, R., Lombardi, A., Olivola, E., Gialluisi, A., Esposito, T. (2021). Analysis of genetic and non-genetic predictors of levodopa induced dyskinesia in Parkinson's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 12. [\[CrossRef\]](#)
24. Tappakhov, A., Popova, T., Govorova, T., Shnaider, N., Sapronova, M. (2020). Pharmacogenetics of drug-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*, 12, 87-92. [\[CrossRef\]](#)
25. Cerri, S., Mus, L., Blandini, F. (2019). Parkinson's disease in women and men: What's the difference? *American Academy of Family Physicians*, 9(3), 501-515. [\[CrossRef\]](#)
26. Olanow, C.W., Stern, M.B., Sethi, K. (2009). The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). *Neurology*, 72(21 Suppl 4), S1-136. [\[CrossRef\]](#)
27. Liu, Y.Z., Tang, B.S., Yan, X.X., Liu, J., Ouyang, D.S., Nie, L.N., Fan, L., Li, Z., Ji, W., Hu, D.L., Wang, D., Zhou, H.H. (2009). Association of the DRD2 and DRD3 polymorphisms with response to pramipexole in Parkinson's disease patients. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 65(7), 679-83. [\[CrossRef\]](#)

28. Rao, S.S., Hofmann, L.A., Shakil, A. (2006). Parkinson's disease: Diagnosis and treatment. *American Academy of Family Physicians*, 74(12), 2046-54. [[CrossRef](#)]
29. Rezak, M. (2007). Current pharmacotherapeutic treatment options in Parkinson's disease. *Disease-a-Month*, 53(4), 214-222. [[CrossRef](#)]
30. Oertel, W., Schulz, J.B. (2016). Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. *Journal of Neurochemistry*, 139(Suppl 1), 325-337. [[CrossRef](#)]
31. Müller, T., Kuhn, W., Möhr, J.D. (2019). Evaluating ADS5102 (amantadine) for the treatment of Parkinson's disease patients with dyskinesia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 20(10), 1181-1187. [[CrossRef](#)]
32. Korczyn, A.D. (2004). Drug treatment of Parkinson's disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 6(3), 315-322. [[CrossRef](#)]
33. Young, J., Mendoza, M., (2018). Parkinson's disease: A treatment guide. *The Journal of Family Practice*, 67(5), 276-279, 284-286. [[CrossRef](#)]
34. Borovac, J.A. (2016). Side effects of a dopamine agonist therapy for Parkinson's disease: a mini-review of clinical pharmacology. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 89(1), 37-47. [[CrossRef](#)]
35. Musey, C.a.S., Vikram (2017). Medical therapies for motor symptoms in Parkinson's disease. *Marshall Journal of Medicine*, 3(4), 50. [[CrossRef](#)]
36. DeMaagd, G., A, Philip. (2015). Parkinson's disease and its management: Part 1: Disease entity, risk factors, pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(8), 504-32. [[CrossRef](#)]
37. Masellis, M., Collinson, S., Freeman, N., Tampakeras, M., Levy, J., Tchelet, A., Eyal, E., Berkovich, E., Eliaz, R.E., Abler, V., Grossman, I., Fitzer-Attas, C., Tiwari, A., Hayden, M.R., Kennedy, J.L., Lang, A.E., Knight, J. (2016). Dopamine D2 receptor gene variants and response to rasagiline in early Parkinson's disease: A pharmacogenetic study. *Brain*, 139(Pt 7), 2050-62. [[CrossRef](#)]
38. Le Couteur, D.G., Leighton, P.W., McCann, S.J., Pond, S. (1997). Association of a polymorphism in the dopamine-transporter gene with Parkinson's disease. *Movement Disorder*, 12(5), 760-3. [[CrossRef](#)]
39. Higuchi, S., Muramatsu, T., Arai, H., Hayashida, M., Sasaki, H., Trojanowski, J.Q. (1995). Polymorphisms of dopamine receptor and transporter genes and Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission. Parkinson's Disease and Dementia Section*, 10(2-3), 107-13. [[CrossRef](#)]
40. Ziegler, D.A., Ashourian, P., Wonderlick, J.S., Sarokhan, A.K., Prelec, D., Scherzer, C.R., Corkin, S. (2014). Motor impulsivity in Parkinson disease: Associations with COMT and DRD2 polymorphisms. *Scandinavian Journal of Psychology*, 55(3), 278-86. [[CrossRef](#)]
41. Rascol, O., Brooks, D.J., Korczyn, A.D., De Deyn, P.P., Clarke, C.E., Lang, A.E. (2000). A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. *The New England Journal of Medicine*, 342(20), 1484-91. [[CrossRef](#)]

42. Comi, C., Ferrari, M., Marino, F., Magistrelli, L., Cantello, R., Riboldazzi, G., Bianchi, M.L.E., Bono, G., Cosentino, M. (2017). Polymorphisms of dopamine receptor genes and risk of L-dopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 242. [\[CrossRef\]](#)
43. Liu, Y.-Z., Tang, B.-S., Yan, X.-X., Liu, J., Ouyang, D.-S., Nie, L.-N., Fan, L., Li, Z., Ji, W., Hu, D.-L., Wang, D., Zhou, H.-H. (2009). Association of the DRD2 and DRD3 polymorphisms with response to pramipexole in Parkinson's disease patients. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 65(7), 679-683. [\[CrossRef\]](#)
44. Becker, M.L., Visser, L.E., van Schaik, R.H.N., Hofman, A., Uitterlinden, A.G., Stricker, B.H.C. (2011). OCT1 polymorphism is associated with response and survival time in anti-Parkinsonian drug users. *Neurogenetics*, 12(1), 79-82. [\[CrossRef\]](#)
45. Altmann, V., Schumacher-Schuh, A.F., Rieck, M., Callegari-Jacques, S.M., Rieder, C.R., Hutz, M.H. (2016). Influence of genetic, biological and pharmacological factors on levodopa dose in Parkinson's disease. *Pharmacogenomics*, 17(5), 481-488. [\[CrossRef\]](#)
46. Ferrari, M., Comi, C., Marino, F., Magistrelli, L., De Marchi, F., Cantello, R., Riboldazzi, G., Bono, G., Cosentino, M. (2016). Polymorphisms of dopamine receptor genes and risk of visual hallucinations in Parkinson's patients. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 72(11), 1335-1341. [\[CrossRef\]](#)
47. Schumacher-Schuh, A.F., Francisconi, C., Altmann, V., Monte, T.L., Callegari-Jacques, S.M., Rieder, C.R., Hutz, M.H. (2013). Polymorphisms in the dopamine transporter gene are associated with visual hallucinations and levodopa equivalent dose in Brazilians with Parkinson's disease. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(6), 1251-1258. [\[CrossRef\]](#)
48. Purcaro, C., Vanacore, N., Moret, F., Di Battista, M.E., Rubino, A., Pierandrei, S., Lucarelli, M., Meco, G., Fattapposta, F., Pascale, E. (2019). DAT gene polymorphisms (rs28363170, rs393795) and levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 690, 83-88. [\[CrossRef\]](#)
49. Białocka, M., Drożdżik, M., Kłodowska-Duda, G., Honczarenko, K., Gawrońska-Szklarz, B., Opala, G., Stankiewicz, J. (2004). The effect of monoamine oxidase B (MAOB) and catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphisms on levodopa therapy in patients with sporadic Parkinson's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, 110(4), 260-6. [\[CrossRef\]](#)
50. Sampaio, T.F., Dos Santos, E.U.D., de Lima, G.D.C., Dos Anjos, R.S.G., da Silva, R.C., Asano, A.G.C., Asano, N.M.J., Crovella, S., de Souza, P.R.E. (2018). MAO-B and COMT genetic variations associated with levodopa treatment response in patients with Parkinson's disease. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 58(7), 920-926. [\[CrossRef\]](#)



MANAGEMENT OF DRUG INTERACTIONS IN COLON CANCER PATIENTS

KOLON KANSERİ HASTALARINDA İLAÇ ETKİLEŞİMLERİNİN YÖNETİMİ

Songül TEZCAN^{1*} 

¹Marmara University, Faculty of Pharmacy, Department of Clinical Pharmacy, 34854, Istanbul, Turkey

ABSTRACT

Objective: Colon cancer is the third most common cancer type globally and usually occurs at advanced ages. Since the risk of comorbid diseases may also increase with age, colon cancer patients have an increased risk of polypharmacy. Hypertension, chronic obstructive pulmonary disease, diabetes, and cardiovascular disease are the frequently seen comorbidities in cancer patients. Patients who are elderly, have comorbid conditions, and are taking two or more medications are at higher risk for drug-drug interactions (DDIs). Additionally, cancer patients frequently use many drugs such as supportive care drugs for the treatment of side effects of cytotoxic drugs. DDIs may cause therapeutic failure or potentially serious adverse events. determination and evaluation of DDI levels identify the most suitable rational therapy for cancer patients.

Result and Discussion: This study has reviewed the drugs used to treat colon cancer (Capecitabine, Fluorouracil, Irinotecan, Oxaliplatin, Bevacizumab, Ziv-Aflibercept, Nivolumab, Pembrolizumab, Ramucirumab, Regorafenib, Larotrectinib, Dabrafenib, Trametinib, Trifluridine and tipiracil, and Encorafenib) and determined the possible drug-drug interactions. This study will help the pharmacists and clinicians to evaluate possible interactions.

Keywords: Colon cancer, comorbidity, drug-drug interactions, management, polypharmacy

ÖZ

Amaç: Kolon kanseri, dünya çapında en yaygın üçüncü kanser türüdür ve genellikle ileri yaşlarda ortaya çıkar. Yaşla birlikte komorbid hastalık riski de artabileceğinden, kolon kanseri hastalarının polifarmasi riski artmıştır. Hipertansiyon, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, diyabet ve kardiyovasküler hastalık, kanser hastalarında sık görülen komorbiditelerdir. Yaşlı, komorbid rahatsızlıkları olan ve iki veya daha fazla ilaç alan hastalar, ilaç-ilaç etkileşimleri (İİE) için daha yüksek risk altındadır. Ayrıca kanser hastaları, sitotoksik ilaçların yan etkilerinin tedavisi için sıklıkla destekleyici bakım ilaçları gibi birçok ilacı kullanmaktadır. İİE'ler terapötik başarısızlığa veya potansiyel olarak ciddi yan etkilere neden olabilir. İİE düzeylerinin belirlenmesi ve değerlendirilmesi, kanser hastaları için en uygun akılcı tedavinin sağlanmasında yardımcı olmaktadır.

Sonuç ve Tartışma: Bu çalışmada, kolon kanseri tedavisinde kullanılan ilaçlar (Kapesitabin, Fluorourasil, irinotecan, oksaliplatin, bevasizumab, ziv-aflibersept, nivolumumab, pembrolizumab, ramusirumab, regorafenib, larotrektinib, dabrafenib, trametinib, trifluridin ve tipirasil ve enkorafenib) incelenmiş ve olası ilaç etkileşimleri belirlenmiştir. Bu çalışma eczacıların ve klinisyenlerin olası etkileşimleri değerlendirmesine yardımcı olacaktır.

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Songül Tezcan
e-mail / e-posta: songulbutur@hotmail.com, **Phone / Tel.:** +905052449918

Anahtar Kelimeler: *İlaç-ilaç etkileşimleri, kolon kanseri, komorbidite, polifarmasi, yönetim*

INTRODUCTION

Numbers of comorbidity and prescribed drugs are strong predictors of DDIs in cancer patients. It is estimated that DDIs lead to 2% of hospital admissions [1,2] and approximately 4% of the cancer related deaths occurs due to the effects caused by DDIs [3]. Determination and management of most serious DDI in cancer patients reduce drug-related problems and increase efficacy and compliance of chemotherapy [4]. This study will be helpful for promotion of rational drug use and prevention and management of drug interactions in colon cancer patients. Therefore, the study has reviewed DDIs using Medscape and Lexicomp databases and highlighted the contraindicated, serious and major DDIs.

Clinic and Research Effects

Capecitabine and 5-Fluorouracil

Capecitabine and 5-Fluorouracil are antimetabolites [fluoropyrimidine] used alone or in combination with other drugs [4-8]. They are mainly metabolized via hepatic enzymes. Although capecitabine is a prodrug of fluorouracil there is no significant differences between the frequency of drug interactions [9]. It is well defined that concomitant warfarin and a fluoropyrimidine elevates the INR [international normalized ratio] and causing bleedings. Additionally, there have been a black box warning for the capecitabine for cancer patients >60 years of age. Both Lexicomp and Medscape recommend that patients who are treated with fluorouracil-based treatment should be monitored for elevated INR and for signs/symptoms of bleeding closely when treatment is combined with a vitamin K antagonist [4-8]. Additionally, anticoagulant dose adjustment would be necessary. Alkylating agents and anthracyclines are two anticancer drug groups that have a moderate drug interaction between fluoropyrimidines cause bone marrow myelosuppression [10].

Irinotecan

Salvador-Martín et al. (2018) reported that the greater the number of concomitant drugs administered, the incidence of severe irinotecan-related toxicity incidence was higher due to the drug interactions. Since the CYP enzyme systems is used for the irinotecan metabolism, CYP inhibitor drugs may increase the toxicity of irinotecan. Interactions between CYP3A4 substrates and irinotecan occur frequently. Concomitant treatment with antiepileptics, certain antidepressants, antiretroviral drugs, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been shown to affect irinotecan pharmacokinetics or pharmacodynamics. The combination with the potent CYP3A4 inhibitor ketoconazole was one of the first significant DDIs described for irinotecan [12]. A severe rhabdomyolysis syndrome has been

described in a patient using irinotecan and citalopram [13]. The drug interactions between irinotecan and certain antiepileptics (phenytoin, phenobarbital, and carbamazepine) were evaluated in a population pharmacokinetic model, which suggested that patients using these antiepileptics should receive higher irinotecan doses to reach the same exposure as in patients without using antiepileptics [14]. In addition, an important DDI between irinotecan and the combination treatment with ritonavir and lopinavir, caused by CYP3A4 inhibition resulted in a more than two-fold increase in SN-38 [15].

NSAIDs and proton pump inhibitors are frequently used in cancer patients. Irinotecan drug interactions with celecoxib and omeprazole have been evaluated and it was investigated that the coadministration of irinotecan and celecoxib described an increased clearance of irinotecan [16]. A clinically relevant pharmacokinetic interaction between omeprazole and irinotecan was ruled out in a small crossover study [17]. The effects of St. John's wort, cigarette smoking, and cannabis tea on irinotecan pharmacokinetics have been investigated. Concomitant use of St. John's wort and cigarette smoking resulted in a significant reduction of SN-38 AUC, primarily caused by CYP3A4 induction [18]. In addition, (medicinal) cannabis can induce CYP3A4 and inhibit ABCB1, but no interaction was demonstrated between irinotecan and medicinal cannabis tea [19], other cannabis formulations contain different concentrations of the enzyme-modulating compounds. Therefore, it remains unclear if cannabinoid oils are safe in combination with irinotecan [18]. The reduced creatinine clearance is associated with irinotecan-related severe toxicities [20]. Incidence of grade 3 or 4 irinotecan-induced neutropenia has been reported in patients with impaired renal function [20]. Table 1 presents commonly seen drug interactions with irinotecan [23, 24].

Oxaliplatin

Since nephrotoxicity and neurotoxicity are the mainly dose-limiting side effects of oxaliplatin it should be used carefully in patients of old age or patients with renal impairment, neuropathy, neurotoxic agents [25, 26]. Oxaliplatin does not significantly inhibit CYP450 isoforms and therefore, drug-drug interactions of oxaliplatin on co-administered drugs cleared by these are not anticipated in the clinic [21, 22]. Additionally, commonly seen drug interactions with oxaliplatin via different mechanisms are gathered in Table 2.

Bevacizumab and Ziv-Aflibercept

Commonly seen drug interactions with bevacizumab via different mechanisms are given in Table 2. There have been no specific drug-drug interaction studies conducted for aflibercept, although population pharmacokinetic analyses found no clinically relevant drug-drug interaction between ziv-aflibercept and irinotecan or fluorouracil [27-30].

Nivolumab and Pembrolizumab

Nivolumab and Pembrolizumab are monoclonal antibodies to programmed cell death-1 protein [PD-1]. Time to steady state levels are 12 weeks for nivolumab and 16 weeks for pembrolizumab and half lives of two drugs over twenty days [31-34].

Table 1. Commonly seen drug interaction with irinotecan via different mechanism [23, 24]

Drugs	Mechanism	Management	Database
Aprepitant	increases serum level of CYP3A4 Substrates [High risk with Inhibitors).	<i>Risk C: Monitor therapy</i>	Lexicomp
Dabrafenib	decreases serum level of CYP3A4 Substrates [High risk with Inducers).	<i>Risk D: Consider therapy modification</i> If concomitant therapy cannot be avoided, monitor for reduced clinical effects of the CYP3A4 substrate.	Lexicomp
Fosaprepitant Fosnetupitant	increases serum level of CYP3A4 Substrates [High risk with Inhibitors).	<i>Risk C: Monitor therapy</i>	Lexicomp
Larotrectinib	increases serum level of CYP3A4 Substrates [High risk with Inhibitors).	<i>Risk C: Monitor therapy</i>	Lexicomp
Palbociclib	increases serum level of CYP3A4 Substrates [High risk with Inhibitors).	<i>Risk C: Monitor therapy</i>	Lexicomp
Carbamazepine	decreases level or effect of irinotecan by affecting hepatic enzyme CYP2B6 metabolism.	<i>Contraindicated.</i>	Medscape
Itraconazole	Increases serum level or effect of irinotecan by affecting hepatic/intestinal enzyme CYP3A4 metabolism.	<i>Contraindicated</i> Strong CYP3A4 Inhibitors may increases serum level of SN-38 [active metabolite for irinotecan products). Contraindicated during and 2 weeks after itraconazole treatment.	Medscape
Lopinavir	Increases serum level or effect of irinotecan by affecting hepatic/intestinal enzyme CYP3A4 metabolism	<i>Contraindicated</i>	Medscape
Rifampin	Decreases serum level or effect of irinotecan by affecting hepatic enzyme CYP2B6 metabolism	<i>Contraindicated</i>	Medscape
Ritonavir	Increases serum level or effect of irinotecan by P-glycoprotein [MDR1) efflux transporter.	<i>Contraindicated</i>	Medscape
St John's Wort	Decreases serum level or effect of irinotecan by P-glycoprotein [MDR1) efflux transporter.	<i>Contraindicated</i>	Medscape

Clinically, the only significant drug interaction of these two drugs is with—systemic corticosteroids. Corticosteroids may decrease the therapeutic effect of Immune Checkpoint Inhibitors [*Risk D: Consider therapy modification*] [31-34]. Recommendations for management of drug

interaction as: to consider the need for corticosteroids, at doses of a prednisone-equivalent of 10 mg or more per day, during the initiation of immune checkpoint inhibitor therapy. Additionally, the use of corticosteroids to treat immune related adverse events is still recommended [31-34].

Table 2. Commonly seen drug interactions with oxaliplatin and bevacizumab via different mechanism

	Drugs	Mechanism	Management	Database
OXALIPLATIN	5-Aminosalicylic Acid Derivatives	increases myelosuppressive effects of oxaliplatin	Risk C: Monitor therapy	Lexicomp
	QT-prolonging Agents	Oxaliplatin increases QTc-prolonging effects	<i>Risk C: Monitor therapy</i> Monitorization for QTc interval prolongation and ventricular arrhythmias of patients used with these combinations.	Lexicomp
	Chloramphenicol [Ophthalmic)	increases adverse effects of oxaliplatin	<i>Risk C: Monitor therapy</i>	Lexicomp
	Clozapine	Oxaliplatin increases adverse/toxic effect of Clozapine	<i>Risk C: Monitor therapy</i> the risk for neutropenia may be increased.	Lexicomp
BEVACIZUMAB	5-Aminosalicylic Acid Derivatives	increases myelosuppressive effects of bevacizumab and Ziv-aflibercept	Risk C: Monitor therapy	Lexicomp
	Bisphosphonate Derivatives	bevacizumab and Ziv-aflibercept may increase the adverse effects of Bisphosphonate Derivatives.	<i>Risk C: Monitor therapy</i> the risk for osteonecrosis of the jaw may be increased.	Lexicomp
	Chloramphenicol [Ophthalmic)	increases myelosuppressive effects of bevacizumab and Ziv-aflibercept	<i>Risk C: Monitor therapy</i>	Lexicomp
	Clozapine	bevacizumab and Ziv-aflibercept may increase the adverse/toxic effect of Clozapine	<i>Risk C: Monitor therapy</i> the risk for neutropenia may be increased.	Lexicomp

Ramucirumab

Ramucirumab has a long half life of 14 days and time to steady state level is 12 weeks [35]. Clinically significant drug interactions occur with combination of bisphosphonate derivatives [*Risk C: Monitor therapy*] by increasing adverse effect of bisphosphonates. Specifically, the risk for osteonecrosis of the jaw may be increased [35, 36].

Regorafenib

Regorafenib has significant drug interactions with strong CYP3A4 inhibitors [clarithromycin, grapefruit juice, itraconazole, ketoconazole, nefazodone, posaconazole, telithromycin, and

voriconazole], Breast Cancer Resistance Protein [BCRP] substrates and UGT substrates [methotrexate, fluvastatin, atorvastatin] [37, 38]. Commonly seen drug interactions with regorafenib via different mechanisms are given in Table 3.

Table 3. Commonly seen drug interactions with regorafenib via different mechanism

Drugs	Mechanism	Management	Database
Aprepitant Fosaprepitant Fosnetupitant	increases serum level of CYP3A4 Substrates	<i>Risk C: Monitor therapy</i>	Lexicomp
Beta-Blockers	Regorafenib may increases bradycardic effect of Beta-Blockers	<i>Risk C: Monitor therapy</i>	Lexicomp
Bisphosphonate Derivatives	Regorafenib may increases adverse effects of Bisphosphonate Derivatives	<i>Risk C: Monitor therapy</i> the risk for osteonecrosis of the jaw may be increased	Lexicomp
Calcium Channel Blockers [Nondihydropyridine]	Regorafenib may increases bradycardic effect of Calcium Channel Blockers [Nondihydropyridine).	<i>Risk C: Monitor therapy</i>	Lexicomp
Digoxin	Regorafenib may increases bradycardic effect of Digoxin.	<i>Risk C: Monitor therapy</i>	Lexicomp
Fusidic Acid [Systemic]	increases serum levels of CYP3A4 Substrates	<i>Risk X: Avoid combination</i>	Lexicomp
Grapefruit Juice	increases serum levels of Regorafenib	<i>Risk X: Avoid combination</i>	Lexicomp
Rosuvastatin	Regorafenib may increases serum level of Rosuvastatin	<i>Risk D: Consider therapy modification</i> Limits dose of rosuvastatin to 10 mg daily when combined with regorafenib. Monitor closely for increased rosuvastatin effects/toxicities [eg, myalgias, rhabdomyolysis) when these agents are combined	Lexicomp
St John's Wort	decreases serum level of Regorafenib.	<i>Risk X: Avoid combination</i>	Lexicomp
Warfarin	increases adverse effects of Regorafenib	<i>Risk C: Monitor therapy</i> the risk for bleeding may be increased	Lexicomp
Food Interactions	A high-fat meal increases mean area under the curve [AUC) of the parent drug.	Administer after a low-fat meal	Lexicomp

Larotrectinib

Larotrectinib is a substrate of CYP3A4 [major], P-gp and BCRP [39, 40]. Coadministration with a strong CYP3A4 inhibitor may increase larotrectinib's plasma levels and may result in increased incidence of adverse effects. Coadministration with a strong CYP3A4 inducer may decrease larotrectinib's plasma levels decrease its efficacy (Table 4).

Table 4. Commonly seen drug interaction with larotrectinib via different mechanism

Drugs	Mechanism	Management	Database
Aprepitant Fosaprepitant Fosnetupitant	increases serum levels of CYP3A4 Substrates [High risk with Inhibitors).	<i>Risk C: Monitor therapy</i>	Lexicomp
CYP3A4 Inhibitors [Strong)	increases serum level of Larotrectinib	<i>Risk D: Consider therapy modification</i> If this combination cannot be avoided, reduces larotrectinib dose by 50%. Increase to previous dose after stopping the inhibitor after a period of 3 to 5 times the inhibitor's half-life.	Lexicomp
Fusidic Acid [Systemic)	increases serum level of CYP3A4 Substrates [High risk with Inhibitors).	<i>Risk X: Avoid combination</i>	Lexicomp
Grapefruit Juice	increases serum level of Larotrectinib.	<i>Risk D: Consider therapy modification</i> If this combination cannot be avoided, reduce the larotrectinib dose by 50%. Following discontinuation of grapefruit juice, resume the previous dose of larotrectinib.	Lexicomp
Triazolam: CYP3A4 Inhibitors [Weak)	increases serum level of Triazolam.	<i>Risk D: Consider therapy modification</i> Consider triazolam dose reduction in patients receiving concomitant weak CYP3A4 inhibitors.	Lexicomp

Dabrafenib

Dabrafenib has an important interaction with hormonal contraceptives. Due to the decrease in efficacy of hormonal contraception, an alternative method of contraception is recommended. Coadministration with CYP3A4 [strong inhibitors or inducers] is not recommended [41, 42]. Drugs that increase gastric acid may decrease dabrafenib absorption [43]. Dabrafenib decreases the serum concentrations of warfarin and dexamethasone [43]. Dabrafenib inhibits certain CYP isoenzymes; concomitant use with drugs may result in loss of efficacy of these drugs (Table 5).

Trametinib

Trametinib is a substrate of CYP2C19 [minor], CYP2D6 [minor], CYP3A4 [major], P glycoprotein/ABCB1 [minor] [44, 45]. Due to the trametinib is a CYP3A4 inducer (low level in vitro), interactions with substrates are not anticipated [45]. Commonly seen drug interaction with Trametinib via different mechanism are listed in Table 6.

Trifluridine and tipiracil

Trifluridine and tipiracil is used for the treatment of metastatic colorectal cancer in adults previously treated with fluoropyrimidine-, oxaliplatin- and irinotecan-based chemotherapy, an anti-VEGF biological

therapy, and an anti-EGFR therapy [46]. This drug may enhance the immunosuppressants effects of certain drugs [baricitinib, cladribine, fexinidazole, natalizumab, pimecrolimus, topical form of ruxolitinib, tacrolimus] and the combination use of these drugs are contraindicated. Additionally, live vaccinations are avoided during therapy with trifluridine and tipiracil [46].

Table 5. Commonly seen drug interaction with dabrafenib via different mechanism

Drugs	Mechanism	Management	Database
Alfentanil	decreases serum level of Alfentanil	<i>Risk D: Consider therapy modification</i> If concomitant use of alfentanil and moderate CYP3A4 inducers is necessary, consider dosage increase of alfentanil until stable drug effects are achieved. Monitor patients for signs of opioid withdrawal.	Lexicomp
Antidiabetic Agents	Dabrafenib decreases therapeutic effect of Antidiabetic Agents.	<i>Risk C: Monitor therapy</i>	Lexicomp
Cannabis	Dabrafenib decreases serum level of Cannabis.	<i>Risk C: Monitor therapy</i>	Lexicomp
Codeine	Dabrafenib decrease serum level of the active metabolite(s) of Codeine.	<i>Risk C: Monitor therapy</i>	Lexicomp
Deflazacort	Dabrafenib decrease serum level of the active metabolite(s) of Deflazacort.	<i>Risk X: Avoid combination</i>	Lexicomp
Estriol	Dabrafenib decreases serum level of Estriol [Systemic, Topical).	<i>Risk C: Monitor therapy</i>	Lexicomp
Progestins [Contraceptive)	Dabrafenib decreases serum level of Progestins [Contraceptive).	<i>Risk D: Consider therapy modification</i> Females of reproductive potential should use an alternative, highly effective, non-hormonal means of contraception during and at least 2 weeks [dabrafenib alone) or 4 months [dabrafenib + trametinib) after discontinuation of dabrafenib treatment.	Lexicomp
QT-prolonging Agents	Dabrafenib increases QTc-prolonging effects	<i>Risk C: Monitor therapy</i> Monitorization for QTc interval prolongation and ventricular arrhythmias of patients used with these combinations.	Lexicomp
St John's Wort	decreases serum level of Dabrafenib.	<i>Risk D: Consider therapy modification</i> If combined therapy cannot be avoided, monitor closely for decreased therapeutic effects of dabrafenib.	Lexicomp
Vitamin K Antagonists (eg, warfarin):	Dabrafenib decreases serum level of Vitamin K Antagonists.	<i>Risk C: Monitor therapy</i>	Lexicomp
Meperidine	Dabrafenib decreases serum level of Meperidine.	<i>Risk C: Monitor therapy</i>	Lexicomp
Prednisolone [Systemic) Prednisone	Dabrafenib decreases serum level of Prednisolone and Prednisone	<i>Risk C: Monitor therapy</i>	Lexicomp

Table 5 (continued). Commonly seen drug interaction with dabrafenib via different mechanism

Drugs	Mechanism	Management	Database
Estrogen Derivatives [Contraceptive]	Dabrafenib decreases serum level of Estrogen derivatives [Contraceptive].	<i>Risk D: Consider therapy modification</i> Females of reproductive potential should use an alternative, highly effective, non-hormonal means of contraception during and at least 2 weeks [dabrafenib alone) or 4 months [dabrafenib + trametinib) after discontinuation of dabrafenib treatment.	Lexicomp
Fusidic Acid [Systemic]	increases serum level of CYP3A4 Substrates [High risk with Inhibitors).	<i>Risk X: Avoid combination</i>	Lexicomp
Hydrocortisone [Systemic]	Dabrafenib decreases serum level of Hydrocortisone [Systemic).	<i>Risk C: Monitor therapy</i>	Lexicomp

Table 6. Commonly seen drug interaction with Trametinib via different mechanism

Drugs	Mechanism	Management	Database
Dabrafenib	enhances adverse/toxic effect of Dabrafenib	<i>Risk C: Monitor therapy</i>	Lexicomp
Clozapine	enhances QTc-prolonging effect of QT-prolonging Kinase Inhibitors [Moderate Risk).	<i>Risk C: Monitor therapy</i> Monitorization for QTc interval prolongation and ventricular arrhythmias of patients used with these combinations.	Lexicomp
Domperidone: QT-prolonging Agents	enhances QTc-prolonging effect of Domperidone.	<i>Risk D: Consider therapy modification</i> Monitorization for QTc interval prolongation and ventricular arrhythmias of patients used with these combinations.	Lexicomp
Fosaprepitant	increases serum level of CYP3A4 Substrates [High risk with Inhibitors)	<i>Risk C: Monitor therapy</i>	Lexicomp
Fusidic Acid [Systemic]	increases serum level of CYP3A4 Substrates [High risk with Inhibitors).	<i>Risk X: Avoid combination</i>	Lexicomp
<ul style="list-style-type: none"> • Haloperidol: QT-prolonging Kinase Inhibitors • Olanzapine • Ondansetron • QT-prolonging Antidepressants • QT-prolonging Antipsychotics • QT-prolonging Class IC Antiarrhythmics • QT-prolonging Kinase Inhibitors 	enhances QTc-prolonging effect.	<i>Risk C: Monitor therapy</i> Monitorization for QTc interval prolongation and ventricular arrhythmias of patients used with these combinations.	Lexicomp

Encorafenib

Encorafenib is indicated for BRAF V600E mutation-positive metastatic colorectal cancer [47, 48]. It acts as a substrate of CYP2C19 [minor], CYP2D6 [minor], CYP3A4 [major], P-glycoprotein/ABCB1 [minor] [48]. It is avoided to use combination with CYP3A4 substrate due to the increasing of the serum drugs levels [abametapir, fusidic acid, pimozide, posaconazole]. Encorafenib doses should be decreased when used in combination with moderate and strong inhibitors of CYP3A4 [45]. Grapefruit juice should not be used during encorafenib therapy because serum concentrations of the drug may increase. Hormonal contraceptives - encorafenib drug interaction is avoided due to the decreasing of the serum concentration of hormonal contraceptives [49].

RESULT AND DISCUSSION

Many potential drug interactions exist with in patients with comorbidities [50, 51]. DDIs may affect plasma level of the oral chemotherapy agent or those of other medications [52]. The use of electronic alerts for potentially serious combinations will be useful for health professionals to determine DDIs in cancer patients. Pharmacists should carefully record all medications and check potential drug interactions. They also should take steps to provide the effectiveness of the cancer therapy, to minimize toxicity and to make recommendations for alternative treatments.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: *S.T.*; Design: *S.T.*; Control: *S.T.*; Sources: *S.T.*; Materials: *S.T.*; Data collection and/or processing: *S.T.*; Analysis and/or interpretation: *S.T.*; Literature Review: *S.T.*; Manuscript Writing: *S.T.*; Critical review: *S.T.*; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no actual, potential or perceived conflicts of interest for this article.

REFERENCES

1. Laban, A.A., Birand, N., Chukwunyere, U., Abdi, A., Basgut, B. (2021). Evaluation of drug-drug interactions in cancer patients treated at a university hospital in North Cyprus using two interaction databases. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 24(7), 1067-1071. [\[CrossRef\]](#)
2. Lavan, A.H., O'Mahony, D., Buckley, M., O'Mahony, D., Gallagher, P. (2019). Adverse drug reactions in an oncological population: prevalence, predictability, and preventability. *The Oncologist*, 24(9), e968-e977. [\[CrossRef\]](#)

3. Montané, E., Castells, X. (2021). Epidemiology of drug-related deaths in European hospitals: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 87(10), 3659-3671. [CrossRef]
4. Ismail, M., Khan, S., Khan, F., Noor, S., Sajid, H., Yar, S., Rasheed, I. (2020). Prevalence and significance of potential drug-drug interactions among cancer patients receiving chemotherapy. *BMC Cancer*, 20(1), 335. [CrossRef]
5. Capecitabine. In: Lexicomp online [database on the Internet]. Hudson [OH]: Lexicomp, Inc.; 2021 [cited 18 Feb 2021]. Available from: <http://online.lexi.com>. Subscription required to view.
6. Medscape Web site. (2022). Retrieved April 17, 2022, from <https://reference.medscape.com/drug/xeloda-capecitabine-342211> .Accessed Date: 17.04.2022
7. Fluorouracil. In: Lexicomp online [database on the Internet]. Hudson [OH]: Lexicomp, Inc.; 2021 [cited 18 Feb 2021]. Available from: <http://online.lexi.com>. Subscription required to view.
8. Medscape Web site. (2022). Retrieved April 17, 2022, from <https://reference.medscape.com/drug/adrucil-fluorouracil-342092#3> .Accessed Date: 17.04.2022
9. Ramírez, J., House, L.K., Karrison, T.G., Janisch, L.A., Turcich, M., Salgia, R., Ratain, M.J., Sharma, M.R. (2019). Prolonged pharmacokinetic interaction between capecitabine and a CYP2C9 substrate, celecoxib. *Journal of Clinical Pharmacology*, 59(12), 1632-1640. [CrossRef]
10. Vayalil, R.K., Shetty, K.J., Mateti, U.V. (2018). Assessment of potential drug–drug interactions in an oncology unit of a tertiary care teaching hospital. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*, 39, 436-42. [CrossRef]
11. Salvador-Martín, S., García-González, X., García, M.I., Blanco, C., García-Alfonso, P., Robles, L., Grávalos, C., Pachón, V., Longo, F., Martínez, V., Sanjurjo-Sáez, M., López-Fernández, L.A. (2018). Clinical utility of ABCB1 genotyping for preventing toxicity in treatment with irinotecan. *Pharmacological Research*, 136, 133-139. [CrossRef]
12. Kehrer, D.F., Mathijssen, R.H., Verweij, J., de Bruijn, P., Sparreboom, A. (2002). Modulation of irinotecan metabolism by ketoconazole. *Journal of Clinical Oncology: Official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(14), 3122-3129. [CrossRef]
13. Richards, S., Umbreit, J.N., Fanucchi, M.P., Giblin, J., Khuri, F. (2003). Selective serotonin reuptake inhibitor-induced rhabdomyolysis associated with irinotecan. *Southern Medical Journal*, 96(10), 1031-1033. [CrossRef]
14. Berg, A.K., Buckner, J.C., Galanis, E., Jaeckle, K.A., Ames, M.M., Reid, J.M. (2015). Quantification of the impact of enzyme-inducing antiepileptic drugs on irinotecan pharmacokinetics and SN-38 exposure. *Journal of Clinical Pharmacology*, 55(11), 1303-1312. [CrossRef]
15. Corona, G., Vaccher, E., Sandron, S., Sartor, I., Tirelli, U., Innocenti, F., Toffoli, G. (2008). Lopinavir-ritonavir dramatically affects the pharmacokinetics of irinotecan in HIV patients with Kaposi's sarcoma. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 83(4), 601-606. [CrossRef]
16. Javle, M.M., Cao, S., Durrani, F.A., Pendyala, L., Lawrence, D.D., Smith, P.F., Creaven, P. J., Noel, D.C., Iyer, R.V., Rustum, Y.M. (2007). Celecoxib and mucosal protection: translation from

- an animal model to a phase i clinical trial of celecoxib, irinotecan, and 5-fluorouracil. *Clinical Cancer Research: An official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(3), 965-971. [CrossRef]
17. van der Bol, J.M., Loos, W.J., de Jong, F.A., van Meerten, E., Konings, I.R., Lam, M.H., de Bruijn, P., Wiemer, E.A., Verweij, J., Mathijssen, R.H. (2011). Effect of omeprazole on the pharmacokinetics and toxicities of irinotecan in cancer patients: a prospective cross-over drug-drug interaction study. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 47(6), 831-838. [CrossRef]
 18. de Man, F.M., Goey, A., van Schaik, R., Mathijssen, R., Bins, S. (2018). Individualization of Irinotecan treatment: a review of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics. *Clinical Pharmacokinetics*, 57(10), 1229-1254. [CrossRef]
 19. Engels, F.K., de Jong, F.A., Sparreboom, A., Mathot, R.A., Loos, W.J., Kitzen, J.J., de Bruijn, P., Verweij, J., Mathijssen, R.H. (2007). Medicinal cannabis does not influence the clinical pharmacokinetics of irinotecan and docetaxel. *The Oncologist*, 12(3), 291-300. [CrossRef]
 20. Fujita, K., Matsumoto, N., Ishida, H., Kubota, Y., Iwai, S., Shibamura, M., Kato, Y. (2019). Decreased disposition of anticancer drugs predominantly eliminated via the liver in patients with renal failure. *Current Drug Metabolism*, 20(5), 361-376. [CrossRef]
 21. Jansman, F.G., Idzinga, F.S., Smit, W.M., de Graaf, J.C., Coenen, J.L., Sleijfer, D.T., Brouwers, J.R. (2005). Classification and occurrence of clinically significant drug interactions with irinotecan and oxaliplatin in patients with metastatic colorectal cancer. *Clinical Therapeutics*, 27(3), 327-335. [CrossRef]
 22. Culy, C.R., Clemett, D. Wiseman, L.R. (2000). Oxaliplatin. *Drugs*, 60, 895-924. [CrossRef]
 23. Irinotecan. In: Lexicomp online [database on the Internet]. Hudson [OH]: Lexicomp, Inc.; 2021 [cited 18 Feb 2021]. Available from: <http://online.lexi.com>. Subscription required to view.
 24. Medscape Web site. (2022). Retrieved April 17, 2022, from <https://reference.medscape.com/drug/camptosar-irinotecan-342252#3>. Accessed Date: 17.04.2022
 25. Oxaliplatin. In: Lexicomp online [database on the Internet]. Hudson [OH]: Lexicomp, Inc.; 2021 [cited 18 Feb 2021]. Available from: <http://online.lexi.com>. Subscription required to view.
 26. Barlow, A., Prusak, E.S., Barlow, B., Nightingale, G. (2021). Interventions to reduce polypharmacy and optimize medication use in older adults with cancer. *Journal of Geriatric Oncology*, 12(6), 863-871. [CrossRef]
 27. Bevacizumab. In: Lexicomp online [database on the Internet]. Hudson [OH]: Lexicomp, Inc.; 2021 [cited 18 Feb 2021]. Available from: <http://online.lexi.com>. Subscription required to view.
 28. Medscape Web site. (2022). Retrieved April 17, 2022, from <https://reference.medscape.com/drug/avastin-mvasi-bevacizumab-342257#11>. Accessed Date: 17.04.2022
 29. Ziv-Aflibercept. In: Lexicomp online [database on the Internet]. Hudson [OH]: Lexicomp, Inc.; 2021 [cited 18 Feb 2021]. Available from: <http://online.lexi.com>. Subscription required to view.

30. Medscape Web site. (2022). Retrieved April 17, 2022, from <https://reference.medscape.com/drug/zaltrap-ziv-aflibercept-999765#5>. Accessed Date: 17.04.2022
31. Nivolumab. In: Lexicomp online [database on the Internet]. Hudson [OH]: Lexicomp, Inc.; 2021 [cited 18 Feb 2021]. Available from: <http://online.lexi.com>. Subscription required to view.
32. Medscape Web site. (2022). Retrieved April 17, 2022, from <https://reference.medscape.com/drug/opdivo-nivolumab-999989#3>. Accessed Date: 17.04.2022
33. Pembrolizumab. In: Lexicomp online [database on the Internet]. Hudson [OH]: Lexicomp, Inc.; 2021 [cited 18 Feb 2021]. Available from: <http://online.lexi.com>. Subscription required to view.
34. Medscape Web site. (2022). Retrieved April 17, 2022, from <https://reference.medscape.com/drug/keytruda-pembrolizumab-999962>. Accessed Date: 17.04.2022
35. Ramucirumab. In: Lexicomp online [database on the Internet]. Hudson [OH]: Lexicomp, Inc.; 2021 [cited 18 Feb 2021]. Available from: <http://online.lexi.com>. Subscription required to view.
36. Medscape Web site. (2022). Retrieved April 17, 2022, from <https://reference.medscape.com/drug/cyramza-ramucirumab-999926>. Accessed Date: 17.04.2022
37. Regorafenib. In: Lexicomp online [database on the Internet]. Hudson [OH]: Lexicomp, Inc.; 2021 [cited 18 Feb 2021]. Available from: <http://online.lexi.com>. Subscription required to view.
38. Medscape Web site. (2022). Retrieved April 17, 2022, from <https://reference.medscape.com/drug/stivarga-regorafenib-999774#3>. Accessed Date: 17.04.2022
39. Larotrectinib. In: Lexicomp online [database on the Internet]. Hudson [OH]: Lexicomp, Inc.; 2021 [cited 18 Feb 2021]. Available from: <http://online.lexi.com>. Subscription required to view.
40. Medscape Web site. (2022). Retrieved April 17, 2022, from <https://reference.medscape.com/drug/vitrakvi-larotrectinib-1000260#3>. Accessed Date: 17.04.2022
41. Dabrafenib. In: Lexicomp online [database on the Internet]. Hudson [OH]: Lexicomp, Inc.; 2021 [cited 18 Feb 2021]. Available from: <http://online.lexi.com>. Subscription required to view.
42. Gazzé G. (2018). Combination therapy for metastatic melanoma: A pharmacist's role, drug interactions complementary alternative therapies. *Melanoma Management*, 5(2), MMT07. [\[CrossRef\]](#)
43. Yin, H., Wang, Z., Wang, X., Lv, X., Fan, X., Yan, M., Jia, Y., Jiang, L., Cao, J., Liu, Y. (2021). Inhibition of human UDP-glucuronosyltransferase enzyme by dabrafenib: implications for drug-drug interactions. *Biomedical Chromatography: BMC*, 35(11), e5205. [\[CrossRef\]](#)
44. Trametinib. In: Lexicomp online [database on the Internet]. Hudson [OH]: Lexicomp, Inc.; 2021 [cited 18 Feb 2021]. Available from: <http://online.lexi.com>. Subscription required to view.
45. Medscape Web site. (2022). Retrieved April 17, 2022, from <https://reference.medscape.com/drug/mekinist-trametinib-999854#5>. Accessed Date: 17.04.2022
46. Trifluridine and tipiracil. In: Lexicomp online [database on the Internet]. Hudson [OH]: Lexicomp, Inc.; 2021 [cited 19 Nov 2021]. Available from: <http://online.lexi.com>. Subscription required to view.

47. Kopetz, S., Grothey, A., Yaeger, R., Cutsem, E.V., Desai, J., Yoshino, T., Wasan, H., Ciardiello, F., Loupakis, F., Hong, Y.S., Steeghs, N., Guren, T.K., Arkenau, H.T., Garcia-Alfonso, P., Pfeiffer, P., Orlov, S., Lonardi, S., Elez, E., Kim, T.W., Schellens, J.H.M., Guo, C., Krishnan, A., Dekervel, J., Morris, V., Aitana Calvo Ferrandiz, A.C., Tarpgaard, L.S., Braun, M., Gollerkeri, A., Keir, C., Maharry, K., Pickard, M., Christy-Bittel J., Anderson, L., Sandor, V., Josep, T. (2019) Encorafenib, binimetinib, and cetuximab in BRAFV600E-mutated colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 381(17), 1632-1643. [\[CrossRef\]](#)
48. Taberero, J., Grothey, A., Van Cutsem, E., Yaeger, R., Wasan, H., Yoshino, T., Desai, J., Ciardiello, F., Loupakis, F., Hong, Y.S., Steeghs, N., Guren, T.K., Arkenau, H.T., Garcia-Alfonso, P., Elez, E., Gollerkeri, A., Maharry, K., Christy-Bittel, J., Kopetz, S. (2021). Encorafenib plus cetuximab as a new standard of care for previously treated *BRAF* V600E-mutant metastatic colorectal cancer: updated survival results and subgroup analyses from the BEACON study. *Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 39(4), 273-284. [\[CrossRef\]](#)
49. Encorafenib. In: Lexicomp online [database on the Internet]. Hudson [OH]: Lexicomp, Inc.; 2021 [cited 19 Nov 2021]. Available from: <http://online.lexi.com>. Subscription required to view.
50. Moghaddas, A., Adib-Majlesi, M., Sabzghabae, A.M., Hajigholami, A., Riechelmann, R. (2021). Potential drug-drug Interactions in hospitalized cancer patients: a report from the Middle-East. *Journal of Oncology Pharmacy Practice: Official publication of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners*, 27(1), 46-53. [\[CrossRef\]](#)
51. Mouzon, A., Kerger, J., D'Hondt, L., Spinewine, A. (2013). Potential interactions with anticancer agents: a cross-sectional study. *Chemotherapy*, 59(2), 85-92. [\[CrossRef\]](#)
52. Venkatesh, K.M., Swathi, A., Rajendra, H. (2021) Assessment of potential drug-drug interaction among the patients receiving cancer chemotherapy: a cross-sectional study. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 12(2), 79-85. [\[CrossRef\]](#)



DOĞADAN İLHAM ALAN BİYOMİMETİK NANOTAŞIYICI SİSTEMLER

NATURE-INSPIRED BIOMIMETIC NANOCARRIER SYSTEMS

Ezgi AYDIN¹ , Ali AYDIN¹ , Gizem ÇETİNER¹ , Gülşah EREL-AKBABA^{2*} 

¹İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, 35620, İzmir, Türkiye

²İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı,
35620, İzmir, Türkiye

ÖZ

Amaç: *Sentetik, biyolojik ve biyoteknolojik ilaç araştırmalarında sıklıkla kullanılan polimerik ve lipidik yapıdaki nanopartiküler sistemler klinik beklentileri halen istenilen düzeyde karşılayamamaktadır. Yenilikçi bir yaklaşım olarak geliştirilen doğadan ilham alan, biyomimetik nanotaşıyıcılar sahip oldukları yüksek biyouyumluluk, düşük toksisite ve doğal hedefleme yetenekleri nedeniyle gittikçe artan şekilde çalışmalara dahil edilmektedir. Bu derlemenin amacı biyomimetik nanotaşıyıcılar alanında yapılan güncel çalışmalarını ele alarak farmasötik yenilikçi taşıyıcı sistem geliştirme çabasına katkıda bulunmaktadır.*

Sonuç ve Tartışma: *En sık kullanılan biyomimetik sistemler arasında virüs temelli, memeli hücresi temelli ve bakteri-mantar temelli nanotaşıyıcı sistemler bulunmaktadır. Doğanın bize sunduğu bu sistemleri anlama çabası taşıyıcı sistem araştırmalarında bizi daha ileriye götürebilir. Bununla birlikte, kontrol edilebilirlik ve seri üretim gibi sentetik sistemlerin avantajları ile biyolojik sistemlerin yüksek hücre alım ve biyouyumluluk işlevlerinin birleştirilmesi ile daha başarılı nanotaşıyıcı sistemlerin geliştirilme potansiyeli olabilecektir. Böylece, biyomimetik sistemlerin protein, gen ve diğer terapötik ajanların taşınmasındaki rolü artacaktır.*

Anahtar Kelimeler: *Bakteri, biyomimetik, memeli hücreleri, nanopartiküller, virüs*

ABSTRACT

Objective: *Nanoparticulate systems such as polymeric and lipidic nanoparticles, which are frequently used in synthetic, biological and biotechnological drug delivery, struggle to meet clinical expectations at the desired level. Nature-inspired biomimetic nanocarriers developed as an innovative approach, are increasingly included in studies due to their high biocompatibility, low toxicity, and natural targeting capabilities. The aim of this review is to contribute to the development of innovative pharmaceutical carrier system by addressing the current studies in the field of biomimetic nanocarriers.*

Result and Discussion: *Among the most commonly used biomimetic systems are virus-based, mammalian cell-based and bacteria-fungi-based nanocarrier systems. The effort to understand these systems that nature*

* **Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** Gülşah Erel-Akbaba
e-posta / e-mail: gulsah.ere.akbaba@ikcu.edu.tr, **Tel. / Phone:** +00902323293535 - 6120

offers us could take us further in carrier system research. Moreover, there may be potential for more successful nanocarrier systems to be developed by combining the advantages of synthetic systems such as controllability and mass production with the high cellular uptake and biocompatibility functions of biological systems. Thus, the role of biomimetic systems in the transport of proteins, genes and other therapeutic agents will increase.

Keywords: *Bacteria, biomimetic, mammalian cells, nanoparticle, virus*

GİRİŞ

Dünyada ölümlerin yaklaşık %70'i kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, kronik akciğer hastalıkları gibi bulaşıcı olmayan hastalıklardan kaynaklanmaktadır. Geleneksel ilaç uygulamaları yaşamı tehdit eden hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır. Ancak, sitotoksiste, mikrobiyal direnç ve ilaç advers etkileri gibi tedaviyi sınırlayıcı durumlar gözlenmesi nedeniyle bu tür istenmeyen etkilerin üstesinden gelmek için çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir [1].

Son yıllarda, ilaç ve gen taşıma sistemlerinin tasarımında özellikle çevresel uyaranlara yanıt verme becerisine sahip olan ve doğadan ilham alan yenilikçi sistemler güncel araştırma konuları arasına girmiştir [2]. Genel olarak nanopartiküller, 10-1000 nm arasında değişen partikül boyutuna sahip; çözünmüş, hapsedilmiş veya adsorbe edilmiş etkin maddeyi kontrollü olarak açığa çıkaran, doğal ya da sentetik yapılı polimerlerle hazırlanan katı kolloidal sistemlerdir. Bu sistemlerden bazıları polimerik nanopartiküller, lipozomlar, katı lipid nanopartiküller, nanojeller, miseller, nanokristaller, metal nanopartiküller, nanokompleksler, dendrimerler, nanokapsüller, nanofiberler ve nanotüplerdir [3-5].

Nanopartiküler ilaç dağıtım sistemlerine, amacına uygun olarak belirli bir dokuyu hedeflemek, hücre penetrasyonunu arttırmak ve spesifik bir duruma yanıt olarak ilaçları serbest bırakabilmesi sağlayan çeşitli ajanlar (polietilen glikol (PEG), etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), antikorlar, transferin, pH ya da ısıya duyarlı kopolimerler vb.) eklenebilir [4,6,7]. Örneğin, nanopartiküler sistemle hazırlanmış bir antitümöral ilacın yüzeyine yapılan PEGilasyon ile nanopartikülün boyutu 7 nm kadar büyütülerek hem renal filtrasyonu önlenip hem de immün sistem tarafından fagositozu bloke edilebilmiştir. Yine başka bir yüzey modifikasyonu olarak spesifik ligand konjugasyonu ile tümör hücrelerinde aşırı eksprese edilen hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanabilecek ligandlarla tümör hücresi doğrudan hedeflendirilebilmektedir [8,9].

Son zamanlarda, nanoteknolojik yaklaşımlar ile biyomimetik kavramını kombine eden doğadan ilham alan taşıyıcı sistem geliştirme çalışmaları hız kazanmıştır. Biyomimikri, doğadaki modelleri inceleyen ve bu tasarımları kullanarak, taklit ederek veya bunlardan ilham alarak var olan sorunlara yenilikçi çözümler sunan yaklaşım biçimidir. Bu kapsamda doğadan ilham alan nanopartiküller işlevsellik, biyoyumluluk, düşük toksisite, çeşitlilik, tolere edilebilirlik gibi birçok avantaja sahiptirler. Bu derleme yazısı, doğadan ilham alan biyomimetik taşıyıcı sistemlerin tasarımındaki son gelişmelere odaklanmaktadır. Bu kapsamda sıklıkla araştırmalara konu olan biyomimik sistemlerden; virüs temelli,

memeli hücresi temelli ve bakteri-mantar temelli nanotaşıyıcı sistemlere genel bir bakış sağlanarak her bir yaklaşımın çeşitli uygulamaları ve sınırlamaları vurgulanmaktadır (Şekil 1)



Şekil 1. Doğadan ilham alan biyomimetik nanotaşıyıcı sistemlerin sınıflandırılması

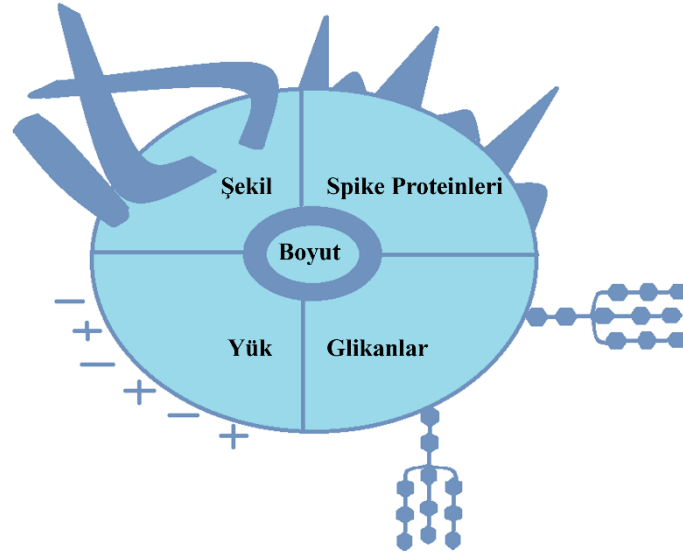
Virüs Temelli Nanotaşıyıcı Sistemler

Virüsler sıkıca düzenlemiş hücreyel yüzey reseptörleri sayesinde bağışıklık sisteminden kaçarken aynı zamanda hedef hücreleri yüksek özgüllükte enfekte etme özelliğine sahiptirler [10]. Ayrıca, doğal olarak bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını engelleme ve genlerini bir konakçıya kopyalatmak amacıyla hücrelere girme yeteneklerinden dolayı ilaç taşıyıcı sistemler için ilham verici olmuşlardır [11].

Virüslerin ligand görevi gören kapsid proteinlerindeki peptid motifleri ile virüs için reseptör görevi gören hedef hücrenin yüzey proteinleri arasındaki çapraz moleküler spesifik etkileşimler, virüsün hücreyi kolayca enfekte etmesini sağlar. Virüslerin tekrarlayan ve düzenli mimarisine dayanan ligand-reseptör bağlanmasının çok değerlikli olması, yüksek derecede doku ve hücre penetrasyonu sağlamaktadır [12]. Tüm bu özelliklerinden dolayı birçok nanopartikül sistem, virüslerden ilham alan yüzey modifikasyonlarıyla geliştirilmiştir (Şekil 2) [10,11].

Virüslerin yüzeyi, kendilerini çevreleyen ortamla etkileşimlerini ve merkezi sinir sistemi gibi spesifik bölmelere dağılımlarını belirlediğinden enfeksiyon süreci için çok önemlidir. Viral yüzey özelliklerinin taklit edilmesi, daha hızlı ve daha büyük nanopartikül-hücre etkileşimlerine yol açabilir ve hatta bariyere penetrasyon yeteneği kazandırabilir. Bu nedenle, sentetik nanopartiküller üzerinde viral özellikler elde etmeye çalışırken bir virüsün yapısal kopyası ilk adım olarak düşünülmelidir. Yapılan çalışmalarda nanopartiküllerin yüzeyine spike proteinleri eklendikten sonra hedefleme ve hücre penetrasyonunda artış olduğu görülmüştür [10].

Virüsler, virion proteinleri ve lipitleri, membran proteinleri ve hücre yüzeyindeki karbonhidrat parçaları sayesinde konak hücrelere verimli bir şekilde bağlanabilirler. Bu bağlanmadan sonra konak hücrelere, endositoz/pinositoz veya füzyon/penetrasyon yoluyla virüs girişi olur. Ayrıca, virüsler konak bağışıklık sisteminden kaçmak için çeşitli stratejiler geliştirmiştir. Virüslerin bu benzersiz yeteneklerinden yararlanılarak biyomimetik nanopartiküller geliştirilmiştir (Tablo 1) [13].



Şekil 2. Nanopartikül tasarımı etkileyen yapısal viral özellikler.

Tablo 1. Viral biyomimetik sistemlerin terapötik uygulamaları

Virüs Mimetik Nanopartiküller	Tanım	Avantajları	Dezavantajları	Uygulamaları
Virüs benzeri partiküller	Virüs türevli proteinlere sahip fosfolipid çift katmanlarından oluşan küresel veziküller.	Farklı ilaçları paketlenme kapasitesi, farklı işlevler kazandırılabilme yeteneği	Tromboz oluşturma riski	Aşı, gen/ilaç taşıyıcı sistem
Virozomlar	Virüs kapsid ve zarf proteinlerinin lipozom kombinasyonu	Üretim ve modifikasyon kolaylığı, biyobozunurluk, biyouyumluluk, endolizozomları teşvik etme	Yüksek immünojenite	Aşı, ilaç taşıyıcı sistem
Kendiliğinden oluşan nanopartiküller	Doğal proteinlerin viral glikoproteinler ve antijenlerle kendiliğinden birleşmesi	Stabilite, immünojeniklik, adjuvanite, biyouyumluluk		Aşı

Virüs Benzeri Partiküller (VLP'ler)

VLP'ler, virüs proteinlerinin nükleik asit genomu veya lipid zarfı olmadan kendi kendine birleşmesiyle oluşan 30-90 nm'lik yapılardır. VLP'ler, büyük ölçüde protein bazlı yapılarının bir sonucu olarak, diğer sentetik nanopartikül sistemlerine göre kontrol ve moleküler seviye hassasiyetinde çok sayıda avantaj sunar [14]. VLP'ler humoral bağışıklık sistemine güçlü antijen sunarak bağışıklık yanıtı oluştururlar. VLP'lerin yüzeyleri, antikor üretimini indüklemek için ideal, tekrarlayan bir yapıya sahiptir [14,15].

VLP'ler, bir rekombinant alt birim aşılardan sınıftır. VLP'ler doğal virüslere benzer, ancak bulaşıcı genetik materyalden yoksundur. VLP'ler, güçlü immünojenisite ve güvenlik nedeniyle umut verici aşılar. Prokaryotik veya ökaryotik ekspresyon sistemlerinde veya *in vitro* olarak üretilir. Birçok hastalığı hedefleyen VLP tabanlı aşı adayları klinik geliştirme aşamasındadır [16].

Piyasada bulunan rekombinant aşılar, GlaxoSmithKline tarafından üretilen Engerix® (hepatit B virüsü [HBV]) ve Cervarix® (insan papilloma virüsü [HPV]) yanında Merck and Co., Inc. Tarafından üretilen Recombivax HB ® (HBV) ve Gardasil ® (HPV), yüksek oranda saflaştırılmış VLP'lere dayanmaktadır [16].

2009–2010 yıllarında yaşanan H1N1 influenza pandemisinde, pandeminin başlangıcından sonra aşı sağlamak için influenza virüsü genetik dizilerinden hızla VLP'ler geliştirilebilmiştir. Bir veya iki doz rekombinant A (H1N1) influenza VLP aşısının güvenliliği ve immünojenisitesi, Meksika'da yürütülen iki aşamalı, Faz 2, randomize, çift kör, plasebo kontrollü bir çalışmada değerlendirilmiş ve ciddi yan etkileri olmadığı, iyi tolere edilebilen güvenli bir aşı olduğu anlaşılmıştır. VLP aşı grupları, tek bir aşılama sonrası plaseboya kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek güçlü bağışıklık tepkileri göstermiştir [17].

Son yıllarda yaşanmakta olan COVID-19 pandemisinin eradikasyonu amacıyla da VLP aşıları umut vadetmektedir. Ülkemizde İhsan ve Mayda Gürsel tarafından geliştirilen ve SARS-CoV-2 antijenleri taşıyacak şekilde tasarlanmış VLP temelli aşı hayvan çalışmalarında etkili bağışıklık yanıtı yol açmıştır ve klinik çalışmaları devam etmektedir [18].

Virozomlar

Virozomlar hedef hücreler ile etkileşimlerinden sorumlu olan viral zarf proteinlerinin lipozomlar ile kombinasyonu ile oluşturulan nanoboyutlu komplekslerdir [19]. Viral proteinleri sayesinde immün sistem hücreleri içerisinde uzun süre kalabilirler. Böylece virozomlar aktif taşıyıcı sistemler olarak kullanılabilir [20]. Virozomlar çoğalmaz. Yüzeylerindeki glikoproteinler, virozoma yapısal stabilite ve homojenlik kazandırır. Aynı zamanda hedeflemeye ve reseptör aracılı endositoza yardımcı olur [21].

Zarla çevrili virüslerin, hücre yüzeylerine bağlanması ve kaynaşması, viral zarf üzerindeki spike glikoproteinleri ile gerçekleştirilir. 1975'de Almeida ve arkadaşları influenza virüsünden türetilen viral spike proteinleri içeren lipozomları geliştirmişlerdir. İnfluenza virüsünden saflaştırılmış önceden oluşturulmuş hemagglutinin (HA), nöraminidaz (NA) ve lipozomlar kullanarak, vezikül yüzeyinden çıkıntı yapan spike proteinlere sahip zar vezikülleri oluşturmayı başarmışlardır [22–24].

Virozomlar, zarlarında viral füzyon proteinleri taşıyan veziküllerdir. İnfluenza virozomları için bu, influenza HA'nın virozomal membrana sabitlendiği anlamına gelir. Kapsüllenmiş materyalin etkili

sitozolik iletimi için, virozomlar, türetildikleri doğal virüsle aynı ölçüde bağlanabilecekleri ve kaynaşabilecekleri uygun şekilde yeniden oluşturulmalıdır [23].

Yapılan bir çalışmada, mukozal bağışıklık tepkisini indüklemek ve COVID-2019 aşısının etkinliğini artırmak için nazal uygulanan solunabilir bir biyoteknolojik virüs nanoaşısı tasarlanmıştır. Solunabilir virozomu taklit eden nanoaşı, nükleik asit, kapsid ve spike proteini dahil olmak üzere SARS-CoV-2'ye benzer bir yapıya sahiptir ve nazal yolla uygulanır. Elde edilen ön sonuçlara göre, geleneksel enjektelerde edilebilir aşıların aksine, solunabilir nanoaşı, solunum mukozal bağışıklığını daha iyi teşvik edebilmiş ve solunum salgılarında virüsü etkili bir şekilde nötralize eden ve virüsün solunum yoluyla vücuda girmesini önleyen yüksek titreli immünoglobulin A salgılayabilmiştir [25].

Virozomların ilaç ve gen iletiminde de uygulamaları, klinik ve prelinik çalışmaları bulunmaktadır. Doksorubisin (kanser tedavisi), HIV proteinleri (AIDS tedavisi), metotreksat (kolon, göğüs, akciğer kanseri) yüklü virozom bazlı çalışmalar literatürde bulunmaktadır [24,26].

Tablo 2. Piyasadaki VLP ve Virozom Bazlı Ürünler [17,24,27]

Ticari adı	Aşının türü	Etkili olduğu hastalık	Taşıyıcı sistem
Gardasil®	Rekombinant HPV	Servikal ve vajinal kanser gibi HPV ile ilişkili hastalık	VLP
Cervarix®	Rekombinant HPV	HPV ile ilişkili hastalık	VLP
Engerix®	Rekombinant HBV	HBV enfeksiyonlarına karşı	VLP
Recombivax HB®	Rekombinant HBV	HBV enfeksiyonlarına karşı	VLP
Epaxal™ (Crucell)	Hepatit A aşısı	Hepatit a enfeksiyonlarına karşı	Virozom
Inflexal® V	Grip aşısı	Grip enfeksiyonlarına karşı	Virozom

Kendiliğinden Oluşan Viral Nanopartiküller

'Kendi kendine montaj' terimi, kovalent olmayan etkileşimler tarafından yönlendirilen, tek tek moleküllerin bir supramoleküler düzenekte kendiliğinden düzenlenmesini ifade eder [28]. Kendiliğinden oluşan nanopartiküller, nanopartikül oluşturma yeteneğine sahip viral glikoproteinlerin kullanılmasıyla elde edilebilir [13].

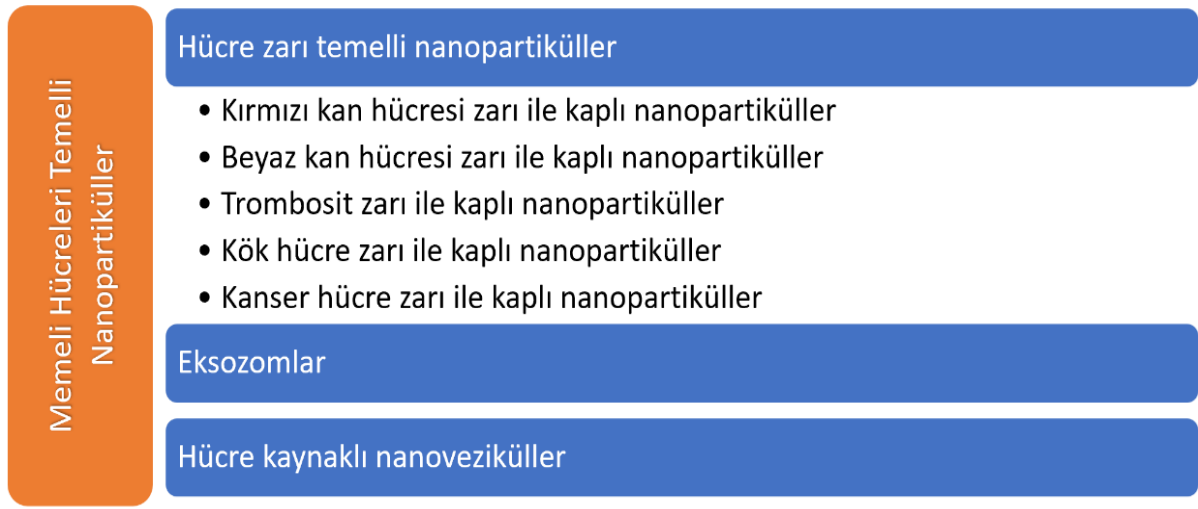
Peptitler ve proteinler, pH, sıcaklık, iyonik kuvvet gibi değişen çevresel koşullara ve ayrıca konakçı ve moleküler etkileşimlere yanıt olarak çeşitli boyut ve şekillerde nanoyapılarda kendi kendine birleşebilir. Kendi kendine birleşen bu nanopartiküller iyi biyoyoumluluk gösterirler ve hem hidrofobik hem de hidrofilik ilaçlar için yüksek yükleme kapasitesine sahiptirler. Kendi kendine bir araya getirilen nanomalzemeler, spesifik olarak tümör hücrelerini hedeflemek için fonksiyonel kısımlarla modifiye edilebilir. Böylece kanser tedavisinde yüksek potansiyele sahip olabilirler [29].

VLP bazlı aşılar yüksek üretim maliyeti ve istenmeyen immünojenisite özelliklerinden dolayı aşı etkinliğini sınırlarken, kendiliğinden birleşen nanopartiküller ise tipik olarak biyoyoumluluk ve biyolojik olarak parçalanabilirlik avantajı sunarlar [29].

Hücre yüzeyi ile ilişkili viral glikoproteinlerin, hücrel sitotoksinite ve antiviral immün gözetiminde hedef antijenler olarak önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir [30]. Kanekiyo ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada Epstein-Barr virüsü (EBV)'ne karşı immünite oluşumdan sorumlu olan EBV glikoprotein 350/220'nin farklı domainlerini içeren bir kendiliğinden oluşan nanopartikül bazlı aşı tasarımı yapılmıştır. İlgili glikoproteinin CR2-bağlanma bölgesini içeren nanopartiküllerle uygulanması sonucu farelerde ve insan olmayan primatlarda güçlü nötralize edici antikor cevabı elde edilmiştir [31].

Memeli Hücreleri Temelli Nanopartiküller

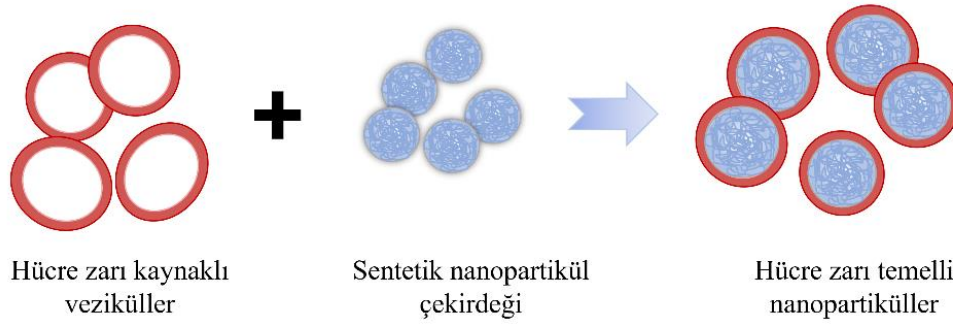
Memeli hücreleri temelli nanopartiküller genel olarak hücre zarı temelli nanopartiküller, eksozomlar ve hücre kaynaklı nanoveziküller olarak üç bölüme ayrılabilirler (Şekil 3).



Şekil 3. Memeli hücreleri temelli nanopartiküllerin sınıflandırılması

Hücre Zarı Temelli Nanopartiküller

Hücre zarı temelli nanopartiküllerin; ilaç taşınmasında kullanılması, detoksifikasyon ve bağışıklık modülasyonu olmak üzere üç temel uygulama üzerinde çalışmaları mevcuttur [32]. Nanopartiküllerin hücre zarıyla kaplanması sonucunda, nanopartiküller hücre zarının doğal fizikokimyasal özelliklerini ve zara bağlı proteinler, antijenler ve immünolojik parçaların varlığından dolayı da hücre zarının biyolojik işlevlerini kazanırlar [33]. Hücre zarı ile kaplanmış nanopartiküllerin immünosupresif ve hastalık hedefleme yetenekleri yanında uzun dolaşım süreleri gelecek için umut vaat etmektedir. Hücre zarı kaplı nanopartiküller; kırmızı kan hücresi zarı, beyaz kan hücresi zarı, trombosit zarı, kök hücre zarı ve kanser hücre zarı gibi kaynak hücrelerin türüne göre sınıflandırılmaktadırlar [34,35]. Kaynak hücreler ve nanoparçacık çekirdekleri birleştirilebilir ve çok sayıda terapötik uygulama için hücre zarı kaplı nanopartiküller elde edilebilir (Şekil 4) [36]



Şekil 4. Hücre zarı kaplı nanopartiküllerin temel bileşenlerinin temsili gösterimi

Kırmızı Kan Hücresi Zarı İle Kaplı Nanopartiküller (KKHNP)

İlaç taşınması çalışmalarında 30 yılı aşkın süredir araştırılmakta olan kırmızı kan hücreleri (KKH) mikrolitre başına 5 milyon olmak üzere toplamda insan vücudundaki sayısı 30 trilyona ulaşan hücresel bileşenlerdir [37,38]. KKH'leri oksijenin hemoglobin yoluyla tüm vücuda taşınmasında görev alırlar. Yapıları esnek, disk şeklinde ve liflidir. KKH'leri insan vücudunda 120 güne kadar yaşarlar. Olgun kırmızı kan hücrelerinin çekirdeği ve organelleri olmadığı için KKH membranlarının ekstraksiyonu ve saflaştırılması diğer hücrelere göre daha uygundur [33,39]. Aynı zamanda kanda bol miktarda bulduklarından izole edilmeleri kolaydır [36].

KKH'ler, sınırlı immün hücre klirensi olan organlardan ve kardiyovasküler sistemden serbestçe geçebilirler [33,40]. Uzun dolaşım yarı ömrüne sahip, biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir olmalarından dolayı ilaç dağıtım sistemlerinde yaygın şekilde kullanılmaktadırlar [41]. KKH'lerin uzun süreli dolaşımında kalmasındaki faktör, transmembran proteini olan CD47'nin makrofajların fagositozundan korunmak için inhibitör reseptör SIRP α ile etkileşime girmesidir [42]. Barclay ve arkadaşları 2014 yılında yaptıkları çalışmayla, kırmızı kan hücrelerinin zarındaki CD47'nin makrofajlarda bulunan sinyal düzenleyici protein olan SIRP α ile etkileşime girerek "beni yeme" sinyali ürettiğini ortaya çıkarmışlardır. KKHNP'ler retiküloendotelyal sistemden kaçma özelliği gösterirler [43]. KKH membranlarındaki C8 bağlayıcı protein, homolog kısıtlama proteini, bozunma hızlandırıcı faktör, membran kofaktör proteini ve tamamlayıcı reseptör 1 gibi diğer yüzey membran proteinleri de kompleman sistemin elemanlarının yapışmasını inhibe eder [43].

KKH'leri çevreleyen ortamın ozmotik basıncın azalmasıyla, KKH'ler şişerek küresel hale geçerler [44]. Bu şişme özelliği, eritrositlerin ilaç ve diğer kimyasallarla yüklenmesinin fizibilitesini oluşturur. İlaç taşınmasında KKH'lerin kullanılmasının avantajları arasında uzun süreli dolaşımında kalması ve bağışıklık sisteminden kaçabilmeleri, yapılarında bulunan fazla miktarda hücre zarı sayesinde yüksek yük kapasitesine kolayca ulaşabilmeleri, biyolojik olarak parçalanabilir olmaları ve oluşturdukları nanopartiküler sistemlerin stabiliteğini arttırmaları sayılabilir [43].

Günümüzde aktif hedefleme etkinliğine sahip ilaç dağıtım sistemlerinin birçoğu spesifik hedefleme ligandlarının sistemin dış yüzeyine kimyasal yollarla modifikasyonu sonucu oluşturulmaktadır. Kimyasal yollarla yapılan sentez kırmızı kan hücresinin membran bütünlüğünü bozabilir ve yüzey proteinlerinin biyolojik dağılımlarını etkileyebilir. Bu nedenle kimyasal yollarla yapılan modifikasyonlar KKHNP'ler için uygun değildir. Bu dezavantajların üstesinden gelebilmek adına hücre zarlarının işlevselleştirilmesi için yenilikçi bir lipid ekleme teknolojisi geliştirilmiştir [45].

KKHNP'lerin klinikte kullanılmasını kısıtlayan nedenlerden biri zayıf hedefleme özelliğidir [46]. KKHNP'lerin tümörlerde birikme olasılığını arttırdığı kanıtlanmış olsa da bu etki sadece vaskülerize tümörle sınırlıdır [47]. KKHNP'lerin hazırlanmasındaki bir diğer zorluk ise kalite kontrolüdür. KKH membranlarının pirojen ve virüsler tarafından kirletilmemesi ve endojen antijenlere karşı potansiyel bağışıklık tepkilerini engellemek için denatüre proteinli KKHNP'ler elimine edilmelidir [33]. İlaç dağıtımını için etkili taşıyıcılar olmasının yanında KKHNP'ler son zamanlarda zararlı antikor ve toksinlerin temizlenmesinde de kullanılmaktadır [11].

Chai ve arkadaşları kırmızı kan hücresi zarıyla kaplı nanopartiküller ile beyin hedefli ilaç dağıtım sistemleri üzerine çalışma gerçekleştirmişlerdir. Kondoksininden türetilmiş CDX peptidi beyin endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan nikotinik asetilkolin reseptörlerine karşı yüksek bağlanma afinitesi gösterir ve kan beyin bariyerini geçebilmektedir. Bu çalışmada CDX peptidi bir lipid yerleştirme yöntemi ile KKHNP yüzeyine eklenmiştir. Elde edilen CDX-KKHNP hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak umut verici sonuçlar gözlemlenmiştir. Aynı zamanda glioma fare modeli üzerindeki çalışmalarda, doksorubisin yüklü CDX-KKHNP'lerin hedeflenmemiş ilaç formülasyonlarına göre daha üstün terapötik etkinlik ve daha az toksisiteye sahip oldukları da gözlemlenmiştir [48].

Beyaz Kan Hücresi Zarı İle Kaplı Nanopartiküller (BKHNP)

Beyaz kan hücrelerinin yaygın olarak bilinen bir diğer adı lökositlerdir. Lökositlerin çapı 7–20 µm arasındadır. Lökositlerin çoğu amipsi hareket yapar ve böylelikle kan damarlarına ve kan damarlarından da ekstravasküler dokulara kolayca göç edebilirler [34]. Beyaz kan hücrelerinin, monosit-makrofaj, eozinofil, bazofil, nötrofil ve lenfosit olmak üzere alt türleri vardır. Lökositler vücuttaki hasarı iyileştirmede, patojenlerin istilasını önlemede ve bağışıklık için önemlidir [49]. Lökositler iltihap durumlarında inflamasyonu tanıyabilir ve hastalıklı bölgede bilinçli bir şekilde birikebilir [50]. Lökositler kan dolaşımı ile enflamasyonlu bölgelere alınabilirler. Enflamasyonlu dokuya kolayca alınabilmesinin sebebi doku içinde aşırı eksprese olan kemokinlerden dolayıdır. Lökosit zarı, lökositlerin işlevlerini koruyan çeşitli protein ve antijenleri içermektedir. Örnek olarak zar proteinleri, hücreler arası iletişim ve sinyal iletimi gibi hücresel süreçlerde rol almaktadır [49,51]. Bu nedenle lökosit zarı biyomimetik nanosistem oluşturmak için oldukça uygundur. Makrofajlar ile kaplı nanopartiküller makrofaj zarında bulunan fonksiyonel proteinler vasıtasıyla tümör hücrelerinde vasküler

engelleri geçebilme ve moleküler olarak tanıyabilme özelliklerine sahip olabilirler. Aynı zamanda makrofajların içine kapsüllenmiş ilaçların, renal eliminasyonunu azaltır, karaciğer metabolizmasını sınırlandırır ve immün bağışıklığa karşı korurlar. Makrofajlar kandaki uzun dolaşım sürelerine ek olarak ilaçların gecikmiş salınımını da sağlamaktadır [52]. Diğer bir lökosit hücresi olan T lenfositler, tümör tanıma ve baskılamada önemlidirler. Son yıllarda, lökositlerin kanser tedavisi için ilaç ve nanopartikülleri hedeflenmesi zor bölgelere taşımada etkili olduğunu göstermiştir. Sentetik nanopartiküller, tümörlere ve kan sirkülasyonundaki tümöral kaynaklı hücrelere terapötik ilacı verimli bir şekilde iletmek için lökosit yüzey proteinleri ile kaplanabilirler. “Truva atı” olarak adlandırılan bu yaklaşım ile doksorubisin enkapsüle liposomal taşıyıcı sistemlerin dış yüzeyleri beyaz kan hücreleri ile kaplandığında *in vivo* tümör büyümesini diğer tüm gruplara göre anlamlı derecede azalttığı ortaya konmuştur [53].

Lökosit membranı kaplı formülasyonlar ilaç iletimi için uygulanabilir bir yol olsa da dikkat edilmesi gereken sınırlamaları vardır. *İn vitro* kültür, saflaştırma ve sterilizasyon işlemleri sırasında oluşan lökositlerin epigenetik değişiklikleri üretim lotları arasında tekrarlanabilirliğin düşük olmasına sebep olur [54]. Aynı zamanda lökositlerin canlılık ve fonksiyonları, köken alındıkları kaynağın cinsiyet, yaş, sağlık durumu, etnik köken gibi durumlara bağlı olarak değişebilir [55].

Trombosit zarı ile kaplı nanopartiküller (TNP)

Trombositler kemik iliğindeki olgun megakaryositlerden üretilen kanda dolaşan en küçük kan hücreleridir [56]. Mikrolitre başına yaklaşık 150.000-350.000 trombosit vardır. İnsan vücudunun kan dolaşımında ortalama trombositlerin 7-11 gün ömürleri vardır [57]. Trombositler çok çeşitli membran antijenlerine ve fonksiyonel proteinlere sahiptir. Trombositler bir tıkaç oluşturarak yaralı kan damarlarını kapatma özelliklerinin yanında enfeksiyon, ateroskleroz ve kansere kadar çeşitli hastalıkların neden olduğu vasküler hasarın tedavisini hedeflemede kullanılabilir [21,58]. Genel olarak trombositler vasküler yaralanma, yara iyileşmesinde, enflamatuar reaksiyon ve tromboz sonrası hemostaz sürecinde önemli bir rol oynarlar. Son çalışmalar, trombositlerin bu hemostatik davranışlarının farklı yollarla tümörün büyümesini, invazyonunu ve metastazını desteklediği bulunmuştur. Karsinogenez sırasında sızdıran kan damarları veya enflamatuar reaksiyonlar, trombositlerin heterotipik yapışmasını uyurarak tümör trombüsü oluşturur. Oluşan trombüsler bağışıklık sistemi tarafından tanınmaz ve doğal öldürücü hücreler tarafından saldırıya karşı korunurlar. Ayrıca, tümör trombüsü integrinler, p-selektin ve PECAM-1 dahil olmak üzere trombositlerin yüzey proteinleri yoluyla vasküler endotele yapışabilir. Bu mekanizmaların işleyiş mantığı üzerinde çalışılarak TNP'ler farklı yöntemlerle üretilmişlerdir. Trombosit zarı, CD47 (makrofajlardan kaçmasını sağlayan) ve p-selektin (CD44 gibi adhezyon moleküllerine bağlanarak dolaşımdaki tümör hücrelerine yüksek afiniteyle bağlanmasını sağlayan) bakımından zengindir [36,59].

TNP'ler düşük maliyet, yüksek biyouyumluluk, azaltılmış immünojenite ve dolaşımdaki tümör hücrelerini hedefleme yeteneği ile biyomimetik ilaç dağıtım sistemleri için en iyi adaylardan biridir. TNP'lerin multipl myelom ve trombüs tedavisinde, aterosklerozun hedeflendirilmesi ve tespitinde, kanser tedavisinde kullanımlarına dair çalışmalar mevcuttur [33].

Kök Hücre Zarı İle Kaplı Nanopartiküller

Kök hücreler, diğer hücre türlerine farklılaşabilen ve aynı türden daha fazla kök hücre üretmek için kendi kendine replikasyon yeteneğine sahip multipotent progenitör hücrelerdendir [32]. Kök hücrelerin kendileri rejeneratif tıpta ve tümörü hedefleyen ilaç verilmesinde kullanılmaktadır [33]. Kök hücrelerden ilaç vektörü olarak üzerine en çok çalışılan grup mezenkimal kök hücrelerdir (MKH). MKH'ler kanda uzun bir süre dolaşabilirler, bağışıklık sisteminden kaçabilirler ve tümör hücrelerini hedefleyebilen ligandlar içerir [60,61]. MKH'ler kemik iliğinden, plasenta ve göbek kordonundan elde edilebilirler [32]. Birçok moleküler tanıma bölgesi içerdikleri için farklı tümör gruplarına ve gelişim aşamalarına bağlanabilirler [62]. Genel olarak tümörlü hücrelerden salınan spesifik sinyal molekülleri mezenkimal kök hücrelerin yüzeyinde bulunan ve tümör hücresine karşılık gelen yüzey proteinleriyle bağlanırlar ve bağlanmış bu yapı MKH'lerin homing davranışını devam ettirirler. Kanser kapsamında mezenkimal kök hücre membranları, istenmeyen etkileri en aza indirmeye çalışan kemoterapötik ajanlar için ideal birer taşıyıcılardır [32]. MKH membranı ile çevrili nanopartiküllerin membransız nanopartiküllere oranla ilaç salınım süresini uzatmaya yardımcı olur [33]. Ancak, stabilite sorunları, biyolojik kontaminasyon riski ve biyogüvenlik endişeleri bu sistemlerin pratikteki kullanımını sınırlandırmaktadır [62].

Kanser Hücre Zarı İle Kaplı Nanopartiküller (KHZNP)

Kanser hücreleri, sonsuz büyüme potansiyeli, immün kaçış, hücre ölümüne direnç, homolog hedefleme yeteneği, dolaşımda uzun süre kalma gibi çeşitli özelliklere sahiptir. Bu özellikleri kanser hücre zarlarının, antikanser tedavi sistemlerinde bir kaplama malzemesi olarak kullanılmasını sağlar [33]. Hastaların otolog plazmasından ya da bir donörden elde edilmesine gerek duyulmaksızın *in vitro* hücre kültüründen elde edilebilirler [63]. KHZ çapa proteinleri ve hücreleri birbirine bağlamada görev alan çeşitli adhezyon glikoproteinlerini içerir. Bu proteinler; Epcam, N-cadherin, Karsinoembriyjenik antijen ve Galectin-3'tür [36]. Proteinler homotipik bağlanmaya aracılık eder ve membran üzerinde benzer proteinleri eksprese eden benzer hücreler tarafından endositozlanırlar. Böylelikle nanopartikül çekirdeklerinin üzerini kaplayabilirler.

Kanser hücrelerinin doğası gereği immün kaçış ve homolog yapışma özelliklerinden esinlenerek çeşitli KHZNP'ler tümörün hedeflenmesi ve tedavi için tasarlanmıştır ve kanser immünoterapisi için yeni bir araştırma alanıdır. Kanser hücre zarı ile kaplı nanopartiküller, hastanın kendi kanserli hücrelerinin toplanıp hazırlanmasından oluştuğu için bireysel tedaviye olanak sağlamaktadır. Aynı zamanda KHZNP'ler immünoadjuvanları da yükleme yeteneğine sahiptir. Böylelikle

immünoadjuvanlarla birlikte tümörle ilişkili antijenlerin ko-lokalizasyonu ve sinerjisi yoluyla kanser aşısının etkinliği daha da artmaktadır [64].

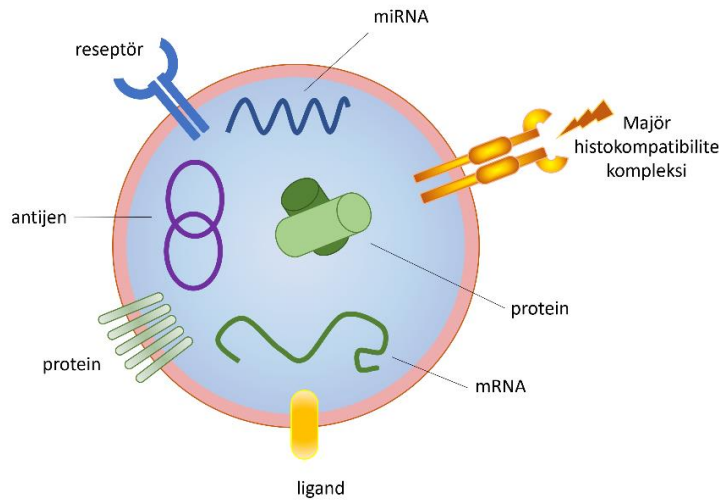
KHZNP'lerin çalışmaları hala laboratuvar aşamalarındadır. KHZNP'ler hazırlanırken kanserojen riskini ortadan kaldırmak için kanser hücrelerinin nükleer ve genetik materyalleri çıkarılmalıdır [32].

Eksozomlar

Eksozomlar, birçok hücreden normal ve patolojik durumlarda salgılanan, endozomal kökenli, boyutları genellikle 40-150 nm aralığında değişen hücre dışı veziküllerdir [65]. Tüm hücre tipleri tarafından salgılanır. Biyoaktif molekülleri, çeşitli proteinleri ve kodlanan ve kodlamayan RNA'ları paketleyen doğal taşıyıcılar olarak hücreler ve dokular arasında bilgi aktarırlar. Son on yılda, eksozomlar, immün terapi, rejeneratif tıp ve ilaç dağıtımında yeni terapötik efektörler olarak ortaya çıkmıştır [66]. Eksozomların yüzeyleri integrinler, füzyon proteinleri, adezyon molekülleri olmak üzere farklı proteinlerle karakterize edilebilmektedir (Şekil 5) [67].

Nanotaşıyıcı olarak eksozomlar; lipit, protein, mitokondriyal ve genomik DNA'yı taşımada doğal yetenekleri olduğu için birçok yapay nanoveziküllere göre daha avantajlıdır. Bu durum eksozomların ilaç taşıyıcısı olarak kullanılabilmesi için umut vaat etmektedir [68]. Eksozomlar, uzun mesafeli hücreler arası iletişimde önemlidirler ve yüklerini farklı hücrelere taşıyarak alıcı hücrenin fenotipini değiştirebildiği gözlemlenmiştir. İstenilen işleve özgü yüzey proteinlerinin eksozomlara dahil edilmesiyle birlikte belirlenen hedefler için tasarlanabilirler.

Eksozomların izolasyonu farklı teknikler kullanılarak yapılmaktadır. En yaygın kullanılan yöntemler santrifüjleme, immünoafinite kromatografisi ve mikroakışkan teknolojilerdir. Eksozomların kullanılmasında bazı sınırlamalar vardır. Bunlar eksozomları yeterli ve hızlı bir şekilde üretmek, izolasyonu ve saflaştırılması için standartlaştırılmış yöntemlerin mevcut olmaması şeklinde sayılabilir [11,69].



Şekil 5. Eksozom bileşenlerinin şematik gösterimi

Sun ve arkadaşları, antiinflamatuvar amaçla kullanılmak üzere kurkumin yüklü eksozomların kullanıldığını bildirmiştir. Kurkumin, zerdeçalın rizomlarında bulunan doğal polifenoldür ve antiinflamatuvar, antioksidan, antineoplastik özelliklere sahiptir. Bu çalışmada bir dağıtım aracı olarak eksozomlar ile taşınan kurkuminlerin daha stabil ve kanda daha yüksek konsantrasyonda olduğu saptanmıştır. Böylelikle hedef özgülüğünü eksozomlar belirledikten sonra kurkuminin aktivitesi artırılmış, terapötik ancak toksik olmayan etkiyle iltihaplı olan hücelere yönlendirilmesi sağlanmıştır [70].

Hücre Kaynaklı Nanoveziküller

Hücre kaynaklı nanoveziküller temelde hücrelerin çeşitli fiziksel işlemlere maruz kalmasıyla elde edilen nano boyutlardaki veziküllerdir [21]. Üretimi için uygulanan yapay yöntemdeki amaç hücrelerin hidrofilik mikrokanallardan zorlanmasıdır. Bu yöntemle elde edilen hücre kaynaklı nanoveziküller, hücrelerden salgılanan eksozomlara yapıca benzerlik gösterir ve plazma membran proteini, hücre içi proteinleri ve mRNA içerirler [71]. Nanoveziküller hücrelerin hedeflendirilmesinde doğal bir yeteneğe sahiptir. Kemoterapötik ilaçları ilgili dokuya ileterek kötü huylu tümörlerin tedavisinde kullanılabilmesine dair çalışmalar mevcuttur [72].

Bakteri Ve Mantarlardan Elde Edilen Nanotaşıyıcı Sistemler

Bakteriler nükleusu veya zarla çevrili organelleri olmayan basit tek hücreli organizmalardır. Bu yaklaşımda bakteriyel ajanlar güvenli hale getirilerek hastalıkların tedavisi için kullanılırlar. *Salmonella spp.* ve *Escherichia coli* gibi fakültatif anaerobların belirli dokuları ve organları aktif olarak hedeflediği bilinmektedir. Belirli proteinleri eksprese eden anaerobik bakterilerin genetiği değiştirilmiş versiyonları terapötik taşıyıcı sistemler olarak kullanıldığında memeli hücrelerinin ilaç alımını arttırabilirler. Bununla birlikte, canlı tasarlanmış bakterilerin terapötik uygulamalarda kullanılmasında tehlikeler ve zorluklar da görülebilir. Canlı bakteri temelli nano-parçacıkları istenmeyen şekilde enfeksiyonlara neden olabileceği gibi, aynı zamanda antibiyotik direnç genlerini vücutta bulunan diğer bakterilere de aktarılabilirler [2].

Bakteriyel toksin, bakteri hayaleti gibi mikroorganizmaların ya da mantarların, ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanımında oldukça umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, *C. novyi NT* bakterisi, tümöre nüfuz etme ve tümörün büyümesini engelleme yeteneği göstermektedir. Bu özelliğine bağlı olarak mikroorganizmanın bütünü yanında sadece belli kısımlarının kullanımı immüno-uyarıcı etki göstermektedir [1].

Baktorefeksiyon

Çıplak veya saflaştırılmış nükleik asitlerin ökaryotik hücelere transferi amacıyla bakterilerin kullanımına baktorefeksiyon denir. Bu yöntemde bakteriyel plazmid, memeli hücreleri tarafından absorbe edilir ve hücrenin genetik materyaline aktarılan ilgili gen ile birleşir [1].

Baktoksezyon, memeli ekspresyon sisteminin kullanılmasını sağlar ve bu nedenle, aynı proteinin bakteriyel hücre kullanılarak ekspresyonuna kıyasla daha güçlü, daha stabil bir ekspresyonla sonuçlanabilir. Bununla birlikte vektörün, hedef dışına sapma olasılığını azaltmak, transfeksiyon ile hedef dokunun transfer verimini ve homojen transfeksiyonu arttırmak amaçlanır. Gen taşınımını sağlayan sistemlerin diğer vektörleriyle karşılaştırıldığında, bakteri hücreleri düşük üretim maliyeti, kolay hazırlığı, daha basit dağıtımı ve daha yüksek iletim yükü gibi özellikleri sayesinde daha avantajlıdır [73].

Örnek olarak *Bifidobacterium longum* (insan gastrointestinal yolağında bulunan patojenik olmayan tür) kanserli dokuya gen iletimi için kullanılmıştır. Tümörlerin içine seçici olarak girebildiği bilinen *Bifidobacterium longum*'un genetiği değiştirilerek endostatin geni ile yüklenmiş ve oral olarak uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlarda karaciğer tümörüne etkin ve yüksek oranda gen aktarımı yapıldığı gözlemlenmiştir [2].

Bakteriye Dayalı Biyoteknolojik Stratejiler

Rekombinant Bakteri

Genetik mühendisliğinde yaşanan gelişmeler, proteinleri (antijenler, antikorlar, sitokinler ve enzimler gibi) kodlayan plazmid vektörlerinin canlı bakterilerde üretilmesine izin vermiştir. Bakteriler, RNA polimerazlara sahip oldukları için ilgili proteinleri üretebilme potansiyeline sahiptir. Bu amaçla kullanılan bakteriler, protein üretimi için en yaygın şekilde tasarlanmış bakteri olan *Lactococcus lactis* gibi patojenik olmayan veya genel olarak güvenli (GRAS) bakteriler ve *Streptococcus gordonii* gibi kommensal bakterileri içerir. Ağız, burun ve vajinal boşluktaki mukozal yüzeylerde kolonize olan bu tür bakteriler, sitokinler ve enzimler gibi biyolojik olarak aktif proteinlerin üretimi ve dağıtımı için potansiyel bir araç görevi görürler [37].

GRAS bakterileri yanında, *Salmonella enterica subsp enterica serovar Typhimurium* gibi canlı zayıflatılmış rekombinant bakteriler de aşı çalışmalarında oldukça olumlu sonuçlar vermiştir [74]. Genel olarak, canlı patojenik mikroorganizma tarafından doğal enfeksiyon, güçlü mukozal ve sistemik bağışıklık tepkileri ortaya çıkarır. Bununla birlikte, zayıflatılmış bakterilerin immün cevabı her zaman olumlu değildir, özellikle bakteriler aşı uygulaması dışındaki uygulamalarda kullanılırsa, burada bağışıklık tepkileri aşılması gereken bir bariyer olarak karşımıza çıkmaktadır [75].

Biyohibrit (Mikro-Robot) Bakteri

Mikrobiyal hücrelerin mikropartiküller, nanopartiküller veya mikro-robotlar gibi canlı olmayan malzemelerle birleştirilmesiyle üstün performans sergileyen biyohibrit bakteriler elde edilebilir [76]. Örneğin, manyetik bir mikro-robot gövdesine bağlanan bakteriler manyetik yönlendirme ile istenen bölgeye hedeflenebilirler. Ayrıca, terapötik ajan yüklü nanopartiküller biyomühendislik ürünü bakteriler

ile hücrelere hedeflenebilirler. Bu sistemler memeli hücrelere penetre olarak taşıdıkları sentetik ilaç, antikör, terapötik peptit veya DNA'nın bakteri aracılığı ile hücre içine girmesine aracılık eder [1].

Biyohibrit yaklaşım, ilaç dağıtım sistemlerinin retiküloendotelial sistem tarafından fagositoza uğramadan önce hedef bölgeye daha hızlı bir şekilde ulaşabilmesini sağlar. Biyohibrit sistemlerin diğer bir avantajı ise biyolojik ve biyolojik olmayan sistemler arasında iş bölümüne izin vermesi, dolayısıyla bakteri hücresinde gerekli mutasyonları azaltmasıdır. Genetiği değiştirilmiş bakterilerin vücutta kullanımına ilişkin ciddi endişeler vardır. Örneğin, herhangi bir mutant zararlı haline geri dönebilir, böylece kontrolü ve muhafazası zorlaşır. Biyohibrit sistemlerde, patojenik olmayan, tercihen gıda sınıfı veya çok az mutasyona sahip veya hiç mutasyona sahip olmayan bakteriler kullanılabilir. PEG gibi birçok farmasötik inert materyal bakteriyel sistemlerin toksik ve immunojenik etkisini azaltmak için biyohibrit sistemlerde kullanılmaktadır [77].

Tümör veya Kanser Hücresi Hedefli Bakteriler

Bakteriler tümörleri istila edebilir, kanser hücrelerinin çoğalması için gerekli besinleri tüketebilir ve kanser hücrelerinde büyüme geriliğine yol açabilirler. Konağın immün sistemini, inflamasyon ile ilişkili yolakları aktif hale getirerek güçlendirirler. Bakterilerin tümör hedefleme kapasitesi de onu tümör tedavisi için uygun bir taşıyıcı yapar [78].

Enfeksiyon aracılı tümör hücrelerinin yıkımına sıklıkla akut toksik etki, septik şok ve ölüm eşlik eder. Bu nedenle tümör hedefleyen suşların immünojenisitelerini azaltmak için genetik olarak modifiye edilmeleri gerekir. Literatürde hücre içi tümör hedefleme uygulamaları amacıyla, normal dokuya kıyasla tümörün kolonizasyonu için kendine özgü bir özelliğe sahip olan ve hipoksik bölgelerde uzun süre etki göstererek doğal olarak kolonize olan zayıflatılmış *S. typhimurium* suşları kullanılmıştır [76].

Chen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada malign melanom tedavisi için melanin benzeri yapıdaki polidopamini (pDA), anaerobik *Salmonella typhimurium* vektörü ile kompleks (pDA-VNP) hale getirilmiştir. Fototermal etkili pDA ile oluşturulan bu kombinasyonun tümör hedefleme özelliğinin araştırıldığı *in vitro* deneylerde fototermal etkili pDA'nın ışımaya altında pDA-VNP ile inkübe edildikten edilen malign melanoma hücrelerinin canlılığının anlamlı derecede azaldığı gözlemlenmiştir. *In vivo* sonuçlar, yakın kızılötesi lazer ışınlanması sonrası tümörlerdeki pDA-VNP miktarının diğer dokulardan daha yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca, pDA-VNP ile tedavi edilen farelerin, tedavi edilmeyenlere göre daha uzun hayatta kalma süresine sahip olduğu gözlemlenmiştir [79].

Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada ise akciğer kanseri tedavisinde inhalasyon yoluyla paklitaksel uygulanması amacıyla, *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Lactobacillus casei* (*L. casei*) bakterileri vektör olarak kullanılmıştır. Geliştirilen paklitaksel içeren lipozom formülasyonun *E. coli* ve *L. casei* vektörlerine entegrasyonu stratejisi, sıçan akciğer kanseri hücrelerinde yüksek

antikanser etki göstermiştir. Bu etki, paklitaksel'in bakteriler aracılı taşınım sayesinde hücre giriş veriminin artması ve ayrıca bakteriyel formülasyonun immunostimüle edici etkisi aracılığı ile gerçekleşmiştir [80].

Bakteri Hayaletler (BH'ler)

BH'ler içi boş ve canlı olmayan gram-negatif bakteri zarfıdır. BH'leri, ilk kez Warner Lubitz tarafından biyolojik bir taşıyıcı olarak genetik bir yöntemle Gram-negatif bakterilerden üretilmiştir [75]. BH'ler, gen E aracılı lizise yol açan klonlanmış bakteriyofaj ϕ X174 gen E'nin kontrollü ekspresyonu ile üretilirler [20].

BH'ler sitoplazmik içerikten yoksundur, ancak hücre yüzey morfolojisi normaldir. BH'ler hedef antijene karşı gelişmiş hümmoral ve hüresel bağışıklık tepkisini tetikler. Vücuda verilmesi istenen ilaç veya takviyeler BH'nin iç ya da dış zarına ve BH oluşumu sırasında kapatılan periplazmasına hedeflenebilir. BH'ler çapraz akış filtrasyonu yoluyla saflaştırılarak toplu fermantasyon ile üretilir. Bakteri inaktivasyonunun güvenliği için saflaştırdıktan sonra oluşan kalıntı bakteri DNA'sı stafilokokal nükleaz A kullanımı veya β -propiolakton ile etkisiz hale getirilir [81].

Yapılan araştırmaya göre *E.coli* bakterisinin hayaletine 5-Flourourasil (5-FU) yüklenerek kolorektal kanseri hedefleyen ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Geliştirilen taşıyıcı sistemin 5-FU'ü istenildiği gibi yavaş bir şekilde saldığı ortaya konmuştur. Ayrıca, *E. coli* hayaletlerinin etkili hedefleme özelliklerinin bir sonucu olarak, yüklenen 5-FU, kolorektal adenokarsinom hücrelerinde umut verici sitotoksik aktivite göstermiştir [82].

BH'ler aşılardaki antijenler için taşıyıcı ve biyouyumlu ilaç dağıtım araçları olarak da kullanılabilir. Ek olarak, yüksek yükleme kapasitelerine sahip olmaları onları ilaç taşıma sistemleri içinde umut vadeden bir seçim haline getirir [83].

Mantarlardan İlham Alan İlaç Taşıyıcı Sistemler

Mantarlar, metallere karşı toleransları ve metal biyobirikim kabiliyetleri sebebiyle metalik nanopartiküllerin biyolojik üretimi üzerine yapılan araştırmalarda ilgi çekmiştir. Bazı mantar türlerinin hızlı ve kolay üretimi laboratuvar ortamında yapılacak araştırmalarda kolaylık sağlar [84].

Son yıllarda, mantarlar ilaç taşıyıcı sistemler olarak yoğun ilgi görmüştür. Yapılan çalışmalarda mantar hücrelerinin ağır metallere karşı tolerans göstermesi nedeniyle, altın (Au) ve gümüş (Ag) gibi ağır metal iyonları için uygun bir taşıyıcı oldukları görülmüştür. Taşıyıcı kullanılmadan metal iyonları toksik metal nanopartiküllere indirgenebilir ve bu da kanser apoptozuna yol açabilir. *Verticillium sp.*, *Colletotrichum sp.* ve *F. oxysporum* gibi Au nanopartikülü üretebilen birçok mantar bulunurken; *Verticillium sp.*, *F. Oxysporum* ve *Volvariella volvacea* mantarlar da Ag nanopartiküllerini biyosentez yoluyla üretebilmektedir [78].

Maya Hücreleri

Maya hücreleri, 5-10 µm çapa sahip oval tek hücreli ökaryotik mantarlardır. Maya hücrelerinin, sitoplazmik içeriğin kaybına yol açan çeşitli fiziksel ve kimyasal işlemlere tabi tutularak hazırlanmış “maya mikrokapsülleri” DNA, proteinler ve ilaçlar için bir taşıyıcı görevi görürler [21].

β-glukandan yapılan maya kapsülleri, M hücreleri üzerindeki dectin-1 tarafından tanınabilir. Bu sayede nanopartiküller, oral kullanım ile bağırsak dokusundan hastalıklı bölgelere taşınabilmektedir. Mikrokapsüller, makrofajlar tarafından Peyer yaması yoluyla alınır ve lenfatik yolla sistemik dolaşıma taşınırlar. Maya mikrokapsülleri, pozitif yüklü partiküller için kılıf oluşturarak içindeki ilaçları stabil hale getirir. Alternatif olarak, maya kapsüllerinin polikasyonlar ile ön işleme tabi tutulması sonucu negatif yüklü nanopartiküller de bu sisteme yüklenebilir. Böylece elektrostatik etkileşimler yoluyla, 750 nm boyutuna kadar olan nanopartikülleri kapsüllemek mümkündür. Ayrıca, maya kapsülünün nispeten yüksek bir dozda bile iyi bir güvenlik profili sergilediği gösterilmiştir [85].

Maya hücreleri, lenfatik sistem yoluyla çeşitli dokulara ve hastalıklı bölgelere taşınabilir. Bu benzersiz istila yolu nedeniyle, maya bazlı taşıyıcılar, çeşitli ilaçların ağızdan verilmesi için umut verici araçlar olarak ortaya çıkmıştır [86].

Biyomimetik Nanotaşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyon ve Stabiliteleri

Tüm ilaç taşıyıcı sistemlerde olduğu gibi biyomimetik nanotaşıyıcı sistemlerin farmasötik amaçlı kullanımları için karakterizasyonlarının uygun yöntemler ile ortaya konması ve stabilitelerinin değerlendirilmesi önemlidir. Örneğin, viral partikülün boyutu konakın immün sisteminden kaçışta önemli rol oynamaktadır. Virüslerin eliminasyonundan sorumlu olan monositler, makrofajlar ve diğer fagositik hücreler, özellikle mikrometre aralığındaki partikülleri boyuta bağlı olarak verimli bir şekilde içine alırlar. Mimivirüs benzeri büyük virüsler (~760 nm çapında), fagositoz yoluyla makrofajlar tarafından elimine edilirken, daha küçük virüsler ise klatrin aracılı endositoz yoluyla hücrelerce içselleştirilebilir. Buna bağlı olarak geliştirilecek nanotaşıyıcıların boyutu nihai hedefe uygun olarak belirlenmelidir [87].

Biyolojik değerlendirmelerden önce nanoparçacıkların fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri için karakterizasyonu gerekmektedir. Hücre zarları; elektron yoğunlukları, protein bileşimleri ve yüzey yükleri ile nanoparçacıkların çekirdeklerinden ayırt edilebilirler. Dolayısıyla da hücre zarlarının nanoparçacıklar üzerinde kaplanıp kaplanmadıkları belirlenebilir. Fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla; hücre zarı temelli nanoparçacıkların çekirdek-kabuk yapısını karakterize etmek için transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanılmaktadır. Çünkü lipid ve proteinlerden oluşan hücre zarları, nanoparçacıkların çekirdeklerine göre genellikle farklı elektron yoğunluğuna sahiptirler. Aynı zamanda hücre zarı ile kaplanmış nanoparçacıkların boyutu ve zeta potansiyeli de değişmektedir. Membran kaplama ile nanoparçacıkların etrafında difüzyon bariyeri oluşturularak nanoparçacıkların

çekirdeklerinden ilaç salımı da geciktirilebilir. Fizikokimyasal özellikler için yapılan karakterizasyon çalışmaları hücre zarı kaplamasının başarılı olup olmadığını ortaya koymaktadır. Biyolojik özellikleri için yapılan karakterizasyon çalışmalarında ise hücre zarlarının nanoparçacıkların yüzeyindeki biyolojik aktivitelerini doğrulamak için yapılır. Bunun için; sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve western blot yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır [88].

Yapılan bir çalışmada kırmızı kan hücresi zarı ile kaplı nanopartikülleri karakterize etmek için partiküller önce uranyl asetat ile negatif olacak şekilde boyanmış ve TEM kullanılarak görselleştirilmiş. Ortaya çıkan görselde beklenildiği gibi bir çekirdek-kabuk yapısı görülmektedir. Parçacık boyutu yaklaşık olarak 80 nm'dir ve bu değer dinamik ışık saçılımı ile ölçülen hidrodinamik çapla eşleşir. Parçacık boyutu yaklaşık 70 nm çapında bir polimerik çekirdekten ve 7-8 nm çapında dış lipid tabakadan oluşmaktadır. Bu lipid tabakasının kalınlığı daha önceden rapor edilen kırmızı kan hücrelerinin membran genişliği ile uyumludur. Sonuçların uyumlu çıkması polimerik partikül yüzeyine başarılı bir membran translokasyonunun olduğunu düşündürmektedir [89].

Biyomimetik nanotaşıyıcı sistemler için önemli bir parameter de stabilitelerinin tespit edilmesidir. *In vivo* sirkülasyonda maruz kalınan seruma karşı stabilitenin saptanması yanında, dinamik ışık saçılı yöntemiyle nanotaşıyıcıların boyut ve polidispersite indeksinin zamana bağlı değerlendirilmesi de oldukça önemlidir [89,90].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu derlemede doğadan ilham alan biyomimetik nanotaşıyıcı sistemler virüs temelli, memeli hücresi temelli ve bakteri-mantar temelli olmak üzere üç temel başlık altında incelenmiştir. Virüs temelli taşıyıcı sistemler; doğal olarak bağışıklık sistem tarafından tanınmasını engelleme ve genlerini bir konakçıya kopyalatmak amacıyla hücrelere girme yeteneklerinden dolayı ilaç taşıyıcı sistemler için ilham verici olmuşlardır. Memeli hücreleri temelli nanopartikül geliştirme yaklaşımında ise hücre zarı kaplı olacak şekilde geliştirilen nanopartiküller yanında hücreden salınan eksozomlar ve hücre kaynaklı nanoveziküller çeşitli treapötiklerin taşınması amacıyla kullanılmaktadır. Bunların yanında bakteri ve mantarların ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanımında da oldukça umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Çeşitli bakterilerin belirli dokuları ve organları aktif olarak hedeflediği bilinmektedir. Ayrıca, anaerobik bakterilerin genetiği değiştirilmiş versiyonları terapötik proteinlerin üretilmesi ve taşınması amacıyla kullanılabilir. Mantarlar ise metallerle karşı gösterdikleri tolerans nedeniyle metalik nanopartiküllerin biyolojik üretimi üzerine yapılan araştırmalarda kullanılmaktadır. Doğanın bize sunduğu bu sistemleri anlama çabası taşıyıcı sistem araştırmalarında bizi daha ileriye götürebilir. Bununla birlikte, kontrol edilebilirlik ve seri üretim gibi sentetik sistemlerin avantajları ile biyolojik sistemlerin olağanüstü dağıtım ve biyoyoumluluk işlevlerinin birleştirilmesi ile daha başarılı nanotaşıyıcı sistemlerin geliştirilme potansiyeli olabilecektir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK-218S840 numaralı proje kapsamında hazırlanmıştır.

YAZAR KATKILARI

Kavram: G.E.A.; Tasarım: G.E.A.; Denetim: G.E.A.; Kaynaklar: E.A., A.A, G.Ç., G.E.A., Literatür taraması: E.A., A.A, G.Ç., G.E.A.; Makalenin yazılması: E.A., A.A, G.Ç., G.E.A.; Kritik inceleme: E.A., A.A, G.Ç., G.E.A.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI

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

KAYNAKLAR

1. Shende, P., Basarkar, V. (2019). Recent trends and advances in microbe-based drug delivery systems. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27, 799-809. [CrossRef]
2. Fu, G.F., Li, X., Hou, Y.-Y., Fan, Y.-R., Liu, W.-H., Xu, G.-X. (2005). Bifidobacterium longum as an oral delivery system of endostatin for gene therapy on solid liver cancer. *Cancer Gene Therapy*, 12, 133-140. [CrossRef]
3. Aminu, N., Bello, I., Umar, N.M., Tanko, N., Aminu, A., Audu, M.M. (2020). The influence of nanoparticulate drug delivery systems in drug therapy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 60, 101961. [CrossRef]
4. Şengel-Türk, C.T., Hasçıçek C. (2009). Polimerik nanopartikuler ilaç taşıyıcı sistemlerde yüzey modifikasyonu. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 38(2), 137-154. [CrossRef]
5. Erel-Akbaba, G., Akbaba, H. (2021). Investigation of the potential therapeutic effect of cationic lipoplex mediated fibroblast growth factor-2 encoding plasmid DNA delivery on wound healing. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29, 329-340. [CrossRef]
6. Torchilin, V.P. (2014). Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(11), 813-827. [CrossRef]
7. Akbaba, H., Karagöz, U., Selamet, Y., Kantarcı, A.G. (2017). Synthesis and characterization of cationic lipid coated magnetic nanoparticles using multiple emulsions as microreactors. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 426, 518-524. [CrossRef]
8. Zhang, H., Liu, J., Chen, Q., Mi, P. (2020). Ligand-installed anti-VEGF genomic nanocarriers for effective gene therapy of primary and metastatic tumors. *Journal of Controlled Release*, 320, 314-327. [CrossRef]

9. Erel-Akbaba, G., Carvalho, L.A., Tian, T., Zinter, M., Akbaba, H., Obeid, P.J., Chiocca, E.A., Weissleder, R., Kantarci, A.G., Tannous, B.A. (2019). Radiation-induced targeted nanoparticle-based gene delivery for brain tumor therapy. *ACS Nano*, 13(4), 4028-4040. [\[CrossRef\]](#)
10. Maslanka Figueroa, S., Fleischmann, D., Goepferich, A. (2021). Biomedical nanoparticle design: what we can learn from viruses. *Journal of Controlled Release*, 329, 552-569. [\[CrossRef\]](#)
11. Parodi, A., Molinaro, R., Sushnitha, M., Evangelopoulos, M., Martinez, J.O., Arrighetti, N., Corbo, C., Tasciotti, E. (2017). Bio-inspired engineering of cell- and virus-like nanoparticles for drug delivery. *Biomaterials*, 147, 155-168. [\[CrossRef\]](#)
12. Unzueta, U., Céspedes, M.V., Vázquez, E., Ferrer-Miralles, N., Mangues, R., Villaverde, A. (2015). Towards protein-based viral mimetics for cancer therapies. *Trends in Biotechnology*, 33(5), 253-258. [\[CrossRef\]](#)
13. Yang, G., Chen, S., Zhang, J. (2019). Bioinspired and biomimetic nanotherapies for the treatment of infectious diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1-17. [\[CrossRef\]](#)
14. Schwarz, B., Uchida, M., Douglas, T. (2017). Biomedical and catalytic opportunities of virus-like particles in nanotechnology. *Advances in Virus Research*, 97, 1-60. [\[CrossRef\]](#)
15. Kanekiyo, M., Buck, C.B. (2017). Virus-like Particle and Nanoparticle Vaccines. In: K. Modjarrad and W.C. Koff (Eds.), *Human Vaccines: Emerging Technologies in Design and Development*, (pp. 87-98). New York: Academic Press. [\[CrossRef\]](#)
16. Kushnir, N., Streatfield, S.J., Yusibov, V. (2012). Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, 31(1), 58-83. [\[CrossRef\]](#)
17. Gadekar, V., Borade, Y., Kannaujia, S., Rajpoot, K., Anup, N., Tambe, V., Kalia, K., Tekade, R.K. (2021). Nanomedicines accessible in the market for clinical interventions. *Journal of Controlled Release*, 330, 372-397. [\[CrossRef\]](#)
18. Yilmaz, I.C., Ipekoglu, E.M., Bulbul, A., Turay, N., Yildirim, M., Evcili, I., Yilmaz, N.S., Guvencli, N., Aydin, Y., Gungor, B., Saraydar, B., Bartan, A.G., Ibibik, B., Bildik, T., Baydemir, İ., Sanli, H.A., Kayaoglu, B., Ceylan, Y., Yildirim, T., Gursel, M. (2022). Development and preclinical evaluation of virus-like particle vaccine against COVID-19 infection. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 77(1), 258-270. [\[CrossRef\]](#)
19. Mbah, C.C., Attama, A.A. (2018). Vesicular carriers as innovative nanodrug delivery formulations. In: A.M. Grumezescu (Ed.), *Organic Materials as Smart Nanocarriers for Drug Delivery*, (pp. 519-559). India: William Andrew Applied Science Publishers. [\[CrossRef\]](#)
20. Loo, Y.S., Bose, R.J., McCarthy, J.R., Mat Azmi, I.D., Madheswaran, T. (2021). Biomimetic bacterial and viral-based nanovesicles for drug delivery, theranostics, and vaccine applications. *Drug Discovery Today*, 26(4), 902-915. [\[CrossRef\]](#)
21. Sabu, C., Rejo, C., Kotta, S., Pramod, K. (2018). Bioinspired and biomimetic systems for advanced drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 287, 142-155. [\[CrossRef\]](#)
22. Almeida, J.D., Edwards, D.C., Brand, C.M., Heath, T.D. (1975). Formation of virosomes from influenza subunits and liposomes. *The Lancet*, 306(7941), 899-901. [\[CrossRef\]](#)

23. Daemen, T., De Mare, A., Bungener, L., De Jonge, J., Huckriede, A., Wilschut, J. (2005). Virosomes for antigen and DNA delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(3), 451-463. [\[CrossRef\]](#)
24. Felnerova, D., Viret, J.F., Glück, R., Moser, C. (2004). Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(6), 518-529. [\[CrossRef\]](#)
25. Zheng, B., Peng, W., Guo, M., Huang, M., Gu, Y., Wang, T., Ni, G., Ming, D. (2021). Inhalable nanovaccine with biomimetic coronavirus structure to trigger mucosal immunity of respiratory tract against COVID-19. *Chemical Engineering Journal*, 418, 129392. [\[CrossRef\]](#)
26. Huda, S., Alam, M.A., Sharma, P.K. (2020). Smart nanocarriers-based drug delivery for cancer therapy: an innovative and developing strategy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 60, 102018. [\[CrossRef\]](#)
27. Correia-Pinto, J.F., Csaba, N., Alonso, M.J. (2013). Vaccine delivery carriers: insights and future perspectives. *International Journal of Pharmaceutics*, 440(1), 27-38. [\[CrossRef\]](#)
28. Whitesides, G.M., Grzybowski, B. (2002). Self-assembly at all scales. *Science*, 295(5564), 2418-2421. [\[CrossRef\]](#)
29. Delfi, M., Sartorius, R., Ashrafizadeh, M., Sharifi, E., Zhang, Y., De Berardinis, P., Zarrabi, A., Varma, R.S., Tay, F.R., Smith, B.R., Makvandi, P. (2021). Self-assembled peptide and protein nanostructures for anti-cancer therapy: targeted delivery, stimuli-responsive devices and immunotherapy. *Nano Today*, 38, 101119. [\[CrossRef\]](#)
30. Khyatti, M., Patel, P.C., Stefanescu, I., Menezes, J. (1991). Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein gp350 expressed on transfected cells resistant to natural killer cell activity serves as a target antigen for EBV-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Journal of Virology*, 65(2), 996-1001. [\[CrossRef\]](#)
31. Kanekiyo, M., Bu, W., Joyce, M.G., Meng, G., Whittle, J.R.R., Baxa, U., Yamamoto, T., Narpala, S., Todd, J.P., Rao, S.S., McDermott, A.B., Koup, R.A., Rossmann, M.G., Mascola, J.R., Graham, B.S., Cohen, J.I., Nabel, G.J. (2015). Rational design of an Epstein-Barr virus vaccine targeting the receptor-binding site. *Cell*, 162(5), 1090-1100. [\[CrossRef\]](#)
32. Xu, C.H., Ye, P.J., Zhou, Y.C., He, D.X., Wei, H., Yu, C.Y. (2020). Cell membrane-camouflaged nanoparticles as drug carriers for cancer therapy. *Acta Biomaterialia*, 105, 1-14. [\[CrossRef\]](#)
33. Choi, B., Park, W., Park, S.B., Rhim, W.K., Han, D.K. (2020). Recent trends in cell membrane-cloaked nanoparticles for therapeutic applications. *Methods*, 177, 2-14. [\[CrossRef\]](#)
34. Li, R., He, Y., Zhang, S., Qin, J., Wang, J. (2018). Cell membrane-based nanoparticles: a new biomimetic platform for tumor diagnosis and treatment. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(1), 14-22. [\[CrossRef\]](#)
35. Zhai, Y., Su, J., Ran, W., Zhang, P., Yin, Q., Zhang, Z., Yu, H., Li, Y. (2017). Preparation and application of cell membrane-camouflaged nanoparticles for cancer therapy. *Theranostics*, 7(10), 2575-2592. [\[CrossRef\]](#)
36. Dash, P., Piras, A.M., Dash, M. (2020). Cell membrane coated nanocarriers - an efficient

- biomimetic platform for targeted therapy. *Journal of Controlled Release*, 327, 546-570. [\[CrossRef\]](#)
37. Yoo, J.W., Irvine, D.J., Discher, D.E., Mitragotri, S. (2011). Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(7), 521-535. [\[CrossRef\]](#)
 38. Föllner, M., Huber, S.M., Lang, F. (2008). Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB Life*, 60(10), 661-668. [\[CrossRef\]](#)
 39. Pierige, F., Serafini, S., Rossi, L., Magnani, M. (2008). Cell-based drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(2), 286-295. [\[CrossRef\]](#)
 40. Jia, Y., Duan, L., Li, J. (2016). Hemoglobin-based nanoarchitectonic assemblies as oxygen carriers. *Advanced Materials*, 28(6), 1312-1318. [\[CrossRef\]](#)
 41. Hu, C.-M.J., Fang, R.H., Zhang, L. (2012). Erythrocyte-inspired delivery systems. *Advanced Healthcare Materials*, 1(5), 537-547. [\[CrossRef\]](#)
 42. Legrand, N., Huntington, N.D., Nagasawa, M., Bakker, A.Q., Schotte, R., Strick-Marchand, H., Geus, S.J. de Pouw, S.M., Böhne, M., Voordouw, A., Weijer, K., Di Santo, J.P., Spits, H. (2011). Functional CD47/signal regulatory protein alpha (SIRP α) interaction is required for optimal human T- and natural killer- (NK) cell homeostasis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(32), 13224-13229. [\[CrossRef\]](#)
 43. Xia, Q., Zhang, Y., Li, Z., Hou, X., Feng, N. (2019). Red blood cell membrane-camouflaged nanoparticles: a novel drug delivery system for antitumor application. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 9(4), 675-689. [\[CrossRef\]](#)
 44. Hamidi, M., Tajerzadeh, H. (2003). Carrier erythrocytes: an overview. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents*, 10(1), 9-20. [\[CrossRef\]](#)
 45. Fang, R.H., Hu, C.M.J., Chen, K.N.H., Luk, B.T., Carpenter, C.W., Gao, W., Li, S., Zhang, D.E., Lu, W., Zhang, L. (2013). Lipid-insertion enables targeting functionalization of erythrocyte membrane-cloaked nanoparticles. *Nanoscale*, 5(19), 8884-8888. [\[CrossRef\]](#)
 46. Kroll, A.V., Frang, R.H., Zhang, L. (2017). Biointerfacing and applications of cell membrane-coated nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry*, 28(1), 23-32. [\[CrossRef\]](#)
 47. Fang, J., Nakamura, H., Maeda, H. (2011). The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(3), 136-151. [\[CrossRef\]](#)
 48. Chai, Z., Hu, X., Wei, X., Zhan, C., Lu, L., Jiang, K., Su, B., Ruan, H., Ran, D., Fang, R.H., Zhang, L., Lu, W. (2017). A facile approach to functionalizing cell membrane-coated nanoparticles with neurotoxin-derived peptide for brain-targeted drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 264, 102-111. [\[CrossRef\]](#)
 49. Li, A., Zhao, J., Fu, J., Cai, J., Zhang, P. (2021). Recent advances of biomimetic nano-systems in the diagnosis and treatment of tumor. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(2), 161-174. [\[CrossRef\]](#)
 50. Gao, C., Wu, Z., Lin, Z., Lin, X., He, Q. (2016). Polymeric capsule-cushioned leukocyte cell membrane vesicles as a biomimetic delivery platform. *Nanoscale*, 8(6), 3548-3554. [\[CrossRef\]](#)

51. Corbo, C., Parodi, A., Evangelopoulos, M., Engler D.K., Matsunami, R.K., Engler, A.C, Tasciotti, E. (2015). Proteomic profiling of a biomimetic drug delivery platform. *Current Drug Targets*, 16(13), 1540-1547. [[CrossRef](#)]
52. Huang, Y., Gao, X., Chen, J. (2018). Leukocyte-derived biomimetic nanoparticulate drug delivery systems for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(1), 4-13. [[CrossRef](#)]
53. Mitchell, M.J., King, M.R. (2015). Leukocytes as carriers for targeted cancer drug delivery. *Expert Opinion Drug Delivery*, 12(3), 375-392. [[CrossRef](#)]
54. Bluestone, J.A. (2005). Regulatory T-cell therapy: is it ready for the clinic? *Nature Reviews Immunology*, 5(4), 343-349. [[CrossRef](#)]
55. Wang, Q., Cheng, H., Peng, H., Zhou, H., Li, P.Y., Langer, R. (2015). Non-genetic engineering of cells for drug delivery and cell-based therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 91, 125-140. [[CrossRef](#)]
56. Patel, S.R., Hartwig, J.H., Italiano, J.E. (2005). The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(12), 3348-3354. [[CrossRef](#)]
57. Harker, L.A., Roskos, L.K., Marzec, U.M., Carter, R.A., Cherry, J.K., Sundell, B., Cheung, E.N., Terry, D., Sheridan, W. (2000). Effects of megakaryocyte growth and development factor on platelet production, platelet life span, and platelet function in healthy human volunteers. *Blood*, 95(8), 2514-2522. [[CrossRef](#)]
58. Chen, Y., Zhao, G., Wang, S., He, Y., Han, S., Du, C., Li, S., Fan, Z., Wang, C., Wang, J. (2019). Platelet-membrane-camouflaged bismuth sulfide nanorods for synergistic radio-photothermal therapy against cancer. *Biomaterials Science*, 7(8), 3450-3459. [[CrossRef](#)]
59. Li, Z., Hu, S., Cheng, K. (2018). Platelets and their biomimetics for regenerative medicine and cancer therapies. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(45), 7354-7365. [[CrossRef](#)]
60. Wu, M., Le, W., Mei, T., Wang, Y., Chen, B., Liu, Z., Xue, C. (2019). Cell membrane camouflaged nanoparticles: a new biomimetic platform for cancer photothermal therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 4431-4448. [[CrossRef](#)]
61. Liu, Y., Luo, J., Chen, X., Liu, W., Chen, T. (2019). Cell membrane coating technology: a promising strategy for biomedical applications. *Nano-Micro Letters*, 11(1), 100. [[CrossRef](#)]
62. Quesada, M.P., García-Bernal, D., Pastor, D., Estirado, A., Blanquer, M., García-Hernández, A.M., Moraleta, J.M., Martínez, S. (2019). Safety and biodistribution of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells injected intrathecally in non-obese diabetic severe combined immunodeficiency mice: preclinical study. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 16(5), 525-538. [[CrossRef](#)]
63. Sherr, C.J. (1996). Cancer cell cycles. *Science*, 274(5293), 1672-1674. [[CrossRef](#)]
64. Yang, R., Xu, J., Xu, L., Sun, X., Chen, Q., Zhao, Y., Liu, Z. (2018). Cancer cell membrane-coated adjuvant nanoparticles with mannose modification for effective anticancer vaccination. *ACS Nano*, 12(6), 5121-5129. [[CrossRef](#)]


65. Stremersch, S., De Smedt, S.C., Raemdonck, K. (2016). Therapeutic and diagnostic applications of extracellular vesicles. *Journal of Controlled Release*, 244, 167-183. [[CrossRef](#)]
66. Tian, T., Zhang, H.X., He, C.P., Fan, S., Zhu, Y.L., Qi, C., Huang, N.P., Xiao, Z.D., Lu, Z.H., Tannous, B.A., Gao, J. (2018). Surface functionalized exosomes as targeted drug delivery vehicles for cerebral ischemia therapy. *Biomaterials*, 150, 137-149. [[CrossRef](#)]
67. Conde-Vancells, J., Rodriguez-Suarez, E., Embade, N., Gil, D., Matthiesen, R., Valle, M., Falcon-Perez, J.M. (2008). Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *Journal of Proteome Research*, 7(12), 5157-5166. [[CrossRef](#)]
68. Camussi, G., Deregibus, M.C., Bruno, S., Cantaluppi, V., Biancone, L. (2010). Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney International*, 78(9), 838-848. [[CrossRef](#)]
69. Kotmakçı, M., Erel-Akbaba, G. (2017). Exosome isolation: is there an optimal method with regard to diagnosis or treatment. In: J. Wang (Ed.), *Novel Implications of Exosomes in Diagnosis and Treatment of Cancer and Infectious Diseases*, (pp.163-182). New York: Intech Open. [[CrossRef](#)]
70. Sun, D., Zhuang, X., Xiang, X., Liu, Y., Zhang, S., Liu, C., Zhang, H.G. (2010). A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(9), 1606-1614. [[CrossRef](#)]
71. Jo, W., Jeong, D., Kim, J., Cho, S., Jang, S., Han, C., Kang, J.Y., Gho, Y.S., Park, J. (2014). Microfluidic fabrication of cell-derived nanovesicles as endogenous RNA carriers. *Lab on a Chip*, 14(7), 1261-1269. [[CrossRef](#)]
72. Jang, S.C., Kim, O.Y., Yoon, C.M., Choi, D.S., Roh, T.Y., Park, J., Nilsson, J., Lötvall, J., Kim Y.K., Gho, Y.S. (2013). Bioinspired exosome-mimetic nanovesicles for targeted delivery of chemotherapeutics to malignant tumors. *ACS Nano*, 7(9), 7698-7710. [[CrossRef](#)]
73. Hosseinidoust, Z., Mostaghaci, B., Yasa, O., Park, B.W., Singh, A.V., Sitti, M. (2016). Bioengineered and biohybrid bacteria-based systems for drug delivery. *In Advanced Drug Delivery Reviews*, 106, 27-44. [[CrossRef](#)]
74. Poo, H., Pyo, H.M., Lee, T.Y., Yoon, S.W., Lee, J.S., Kim, C.J., Sung, M.H., Lee, S.H. (2006). Oral administration of human papillomavirus type 16 E7 displayed on lactobacillus casei induces E7-specific antitumor effects in C57/BL6 mice. *International Journal of Cancer*, 119(7), 1702-1709. [[CrossRef](#)]
75. Harisa, G.I., Sherif, A.Y., Yousof, A.M.E., Alanazi, F.K., Salem-Bekhit, M.M. (2020). Bacteriosomes as a promising tool in biomedical applications: immunotherapy and drug delivery. *AAPS PharmSciTech*, 21(5), 1-13. [[CrossRef](#)]
76. Claesen, J., Fischbach, M.A. (2015). Synthetic microbes as drug delivery systems. *ACS Synthetic Biology*, 4(4), 358-364. [[CrossRef](#)]
77. Rabanel, J.M., Hildgen, P., Banquy, X. (2014). Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation. *Journal of Controlled Release*, 185(1), 71-87. [[CrossRef](#)]

78. Wang, R., Yan, H., Yu, A., Ye, L., Zhai, G. (2021). Cancer targeted biomimetic drug delivery system. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63, 102530. [\[CrossRef\]](#)
79. Chen, W., Wang, Y., Qin, M., Zhang, X., Zhang, Z., Sun, X., Gu, Z. (2018). Bacteria-driven hypoxia targeting for combined biotherapy and photothermal therapy. *ACS Nano*, 12(6), 5995-6005. [\[CrossRef\]](#)
80. Zhang, M., Li, M., Du, L., Zeng, J., Yao, T., Jin, Y. (2020). Paclitaxel-in-liposome-in-bacteria for inhalation treatment of primary lung cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 578, 119177. [\[CrossRef\]](#)
81. Langemann, T., Koller, V.J., Muhammad, A., Kudela, P., Mayr, U.B., Lubitz, W. (2010). The bacterial ghost platform system production and applications. *Bioengineered Bugs*, 1(5), 326-336. [\[CrossRef\]](#)
82. Youssof, A.M.E., Alanazi, F.K., Salem-Bekhit, M.M., Shakeel, F., Haq, N. (2019). Bacterial ghosts carrying 5-fluorouracil: a novel biological carrier for targeting colorectal cancer. *AAPS PharmSciTech*, 20(2), 1-12. [\[CrossRef\]](#)
83. Kudela, P., Koller, V.J., Lubitz, W. (2010). Bacterial ghosts (BGs)-advanced antigen and drug delivery system. *Vaccine*, 28(36), 5760-5767. [\[CrossRef\]](#)
84. Moghaddam, A.B., Namvar, F., Moniri, M., Tahir, P.M., Azizi, S., Mohamad, R. (2015). Nanoparticles biosynthesized by fungi and yeast: a review of their preparation, properties, and medical applications. *Molecules*, 20, 16540-16565. [\[CrossRef\]](#)
85. Hu, X., Zhang, J. (2017). Yeast capsules for targeted delivery: the future of nanotherapy? *Nanomedicine*, 12(9), 955-957. [\[CrossRef\]](#)
86. Hu, X., Yang, G., Chen, S., Luo, S., Zhang, J. (2020). Biomimetic and bioinspired strategies for oral drug delivery. *Biomaterials Science*, 8(4), 1020-1044. [\[CrossRef\]](#)
87. Somiya, M., Kuroda, S. (2015). Development of a virus-mimicking nanocarrier for drug delivery systems: the bio-nanocapsule. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 95, 77-89. [\[CrossRef\]](#)
88. Choi, B., Park, W., Park, S.B., Rhim, W.K., Han, D.K. (2020). Recent trends in cell membrane-cloaked nanoparticles for therapeutic applications. *Methods*, 177, 2-14. [\[CrossRef\]](#)
89. Akbaba, H., Erel-Akbaba, G., Kotmakçı, M., Başpınar, Y. (2020). Enhanced cellular uptake and gene silencing activity of survivin-sirna via ultrasound-mediated nanobubbles in lung cancer cells. *Pharmaceutical Research*, 37(8), 165. [\[CrossRef\]](#)
90. Hu, C.M.J., Zhang, L., Aryal, S., Cheung, C., Fang, R.H., Zhang, L. (2011). Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(27), 10980-10985. [\[CrossRef\]](#)



***PISTACIA LENTISCUS* L. TÜRÜNÜN BOTANİK, ETNOFARMAKOLOJİK, FİTOKİMYASAL VE FARMAKOLOJİK AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

*EVALUATION OF BOTANICAL, ETHNOPHARMACOLOGICAL, PHYTOCHEMICAL AND
PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF PISTACIA LENTISCUS L. SPECIES*

Sultan PEKACAR¹ , Didem DELİORMAN ORHAN^{1*} 

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

ÖZ

Amaç: *Pistacia*, içerisinde *P. lentiscus* gibi tıbbi türleri ihtiva eden Anacardiaceae familyasına ait, Akdeniz havzası boyunca yaygın dağılıma sahip bir cinstir. *P. lentiscus*'un çeşitli kısımları geleneksel tıpta pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Bu derlemede, *P. lentiscus* türünün botanik özellikleri, geleneksel kullanımları, fitokimyasal içeriği ve farmakolojik aktiviteleri ile ilgili kapsamlı bilgiler özetlenmeye çalışılmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Literatür taramaları bu türün antioksidan, antimutajenik, antimikrobiyal, antiviral, antiinflamatuvar, gastrointestinal hastalıklar, karaciğer ve serum biyokimyasal parametreler üzerindeki etkileri, antiaterosklerotik ve antidiyabetik, antiparaziter, antitümör, antikolinesteraz, nöroprotektif ve yara iyileştirici aktivitelerin de olduğu çok çeşitli farmakolojik aktiviteler bakımından değerlendirildiğini göstermiştir. *P. lentiscus* terpenoitler, fenolik bileşikler, yağ asitleri ve steroller gibi çeşitli fitokimyasal bileşenleri ihtiva etmektedir. Yapılan araştırma sonucunda *P. lentiscus* türünün çeşitli farmasötik şekillerde doğal kaynaklı ilaçların geliştirilmesi ve ticarileştirilmesi için önemli bir kaynak olduğu, ama risk faktörlerini daha iyi aydınlatmak adına daha fazla prelinik ve klinik çalışmaya gereksinim duyulduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Etnofarmakoloji, farmakolojik aktivite, fitokimya, *Pistacia*, *Pistacia lentiscus*

ABSTRACT

Objective: *Pistacia* is a genus with widespread distribution throughout the Mediterranean basin, belonging to the Anacardiaceae family, which includes species such as *P. lentiscus*. Various parts of the *P. lentiscus* species are used in traditional medicine for the treatment of many diseases. In this review, comprehensive information about the botanical features, traditional uses, phytochemical content and pharmacological activities of *P. lentiscus* has been tried to be summarized.

Result and Discussion: Literature surveys have shown that this species has been evaluated for a wide variety of pharmacological activities, including antioxidant, antimutagenic, antimicrobial, antiviral, anti-

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Didem Deliorman Orhan
e-posta / e-mail: didemdeliorman@gmail.com, Tel. / Phone: +90 3122023173

inflammatory, gastrointestinal diseases, effects on liver and serum biochemical parameters, antiatherosclerotic and antidiabetic, antiparasitic, antitumor, anticholinesterase, neuroprotective and wound healing activities. P. lentiscus contains various phytochemical components such as terpenoids, phenolic compounds, fatty acids and sterols. As a result of the research, it was concluded that the P. lentiscus species is an important resource for the development and commercialization of natural origin drugs in various pharmaceutical forms, but more preclinical and clinical studies are needed to better elucidate the risk factors.

Keywords: *Ethnopharmacology, pharmacological activity, phytochemistry, Pistacia, Pistacia lentiscus*

GİRİŞ

Tıbbi bitkilerin, çeşitli hastalıkların tedavisinde uzun bir kullanım geçmişine sahip olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda kanser, kardiyovasküler, diyabet, hipertansiyon ve aterosklerozun dahil olduğu çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde tıbbi bitkiler üzerinde yapılmış pek çok prelinik ve klinik çalışma sonuçları yayımlanmaktadır. Bunların yanı sıra tıbbi bitkilerin diğer ilaçların olumsuz etkilerini azaltabildiği, metal veya diğer toksinleri detoksifiye edebildiği, yeni bitkisel ilaçların geliştirilmesinde veya yeni ilaç moleküllerin keşfinde kaynak olarak kullanılabilirdikleri bilinmektedir [1]. *Pistacia*; içerisinde yaklaşık olarak 70 cins ve 600'den fazla tür barındıran Anacardiaceae familyasına ait bir cinstir. *Pistacia* genusu bitkileri, herdem yeşil kalabilen ya da yaprak döken reçine taşıyan 8-10 m boyunda çalı veya ağaçlardır [2]. Bu cinsin çiçekleri rasemus veya panikula çiçek durumunda, tek eşeyli, 1-3 küçük brakteli, 2-7 brakteollüdür ve rüzgarla tozlaşır. Yaprakları ise genellikle pennat damarlanmaya sahip olup, nadiren basit ya da üç yapraklı, derimsi ya da zarımsıdır [3]. Bu cins, Afrika, Güney Avrupa, Asya, Kuzey Amerika gibi farklı bölgelerde genellikle ağaç formundadır. Bu bölgelerin yanı sıra Akdeniz havzası boyunca da yaygın olarak yetişir. *P. lentiscus* L. gibi birçok tür ise Akdeniz'in yarı kurak iklimine ve tuzlu toprağına uyum sağlamıştır. Tuz stresine dayanmak için bu türler çalılara dönüşmüşlerdir [4]. *P. vera* L., *P. atlantica* Desf., *P. terebinthus* L., *P. khinjuk* Stocks. ve *P. lentiscus* Akdeniz ve Orta Doğu'da yaygın bir şekilde yayılış gösteren en ünlü *Pistacia* türleri olarak bilinmektedir [5]. *P. lentiscus*, *P. atlantica*, *P. eurycarpa*, *P. khinjuk*, *P. vera*, *P. terebinthus* türleri ise Türkiye yetişen veya kültürü yapılan türlerdir [6].

Son yıllarda çeşitli ülkelerde yapılan etnobotanik araştırmalar sonucunda, kurak ve yarı kurak bölgelerde yaşayan birçok topluluğun beslenmesinde ve tarım ekonomisinde *Pistacia* türlerinin önemli bir rol oynadığı rapor edilmektedir [7]. *Pistacia* türlerinin farklı kısımları çeşitli farmakolojik aktiviteler için araştırılmış ve iltihap, kanser, enfeksiyon rahatsızlıkları, hipertansiyon ve astım dahil olmak üzere pek çok etnomedikal rahatsızlık için incelendiği bildirilmiştir [2-3]. *Pistacia* cinsi üzerinde yapılan kimyasal çalışmalar neticesinde yüksek miktarda vitamin ve mineralin yanı sıra monoterpenoit, seskiterpenoit, diterpenoit, triterpenoit, fenolik bileşikler, uçucu yağ, sabit yağ ve steroller de taşıdıkları tespit edilmiştir [2]. Bu bağlamda, *P. lentiscus* terpenoitler ve polifenoller açısından zengin, bir çalı olarak bilinmektedir. *P. lentiscus*'da bulunan yüksek polifenol içeriğinin; türün kronik ve dejeneratif hastalıklara karşı kullanımının yanı sıra nutrasötik olarak kullanımını da cazip hale getirmiştir [8]. Bu

çalışmada *P. lentiscus*'un botanik özellikleri, geleneksel kullanımları, fitokimyasal içeriği ve farmakolojik aktiviteleri derlenmiştir.

Botanik

Pistacia cinsi ile ilgili olarak farklı sınıflandırmalar mevcuttur. En bilinenlerinden biri, cinsi yaprak ve meyve morfolojisine göre dört ana gruba ayıran Zohary'nin yapmış olduğu sınıflandırmadır. Bu sınıflandırmaya göre *Pistacia* cinsi *Lenticella*, *Eu lentiscus*, *Butmela* ve *Eu terebintus* isimli dört farklı gruba ayrılmıştır. Akdeniz bölgesinde (Orta Doğu ve Avrupa), en çok temsil edilen türlerden birisi olan *P. lentiscus*, *Eu lentiscus* grubunun bir üyesidir [8]. *P. lentiscus* türüne ait taksonomik sınıflandırma Tablo 1'de verilmiştir [6]. Türün ait olduğu familyanın genel özelliklerine bakıldığında familyadaki bitkilerin çoğunluğu reçineli ve pennat yapraklı ağaçlardır. Çiçekler küçük ve hermafrodit iken kaliks ve korolla 3-5 parçalı; stamen sayısı ise 5 ya da 10'dur. Ovaryumları hipogin olup, 3 karpele sahiptir. Meyve tipi ise drupadır. *P. lentiscus* Türkiye, Avrupa, Fas, Fransa'nın güneyi, Irak, İran'da yayılım gösteren Mart ila Mayıs aylarında çiçeklenme dönemine geçen, yaygın olarak "Sakız Ağacı" ismiyle bilinen bir türdür [4]. Ülkemizde Batı ve Güney Anadolu'da yetişmekte olup kışları yapraklarını dökmez. Bitkinin yaprakları paripennat, çiçekleri ise kırmızı renkli sık bir panikula durumundadır. Ege bölgesinde Çeşme'de ve Sakız Adası'nda *P. lentiscus* var. *chia* isminde bir varyetesi yetiştirilmektedir. Bu ağaçların yaşlı dal gövdesine açılan kesiklerden bir reçine akmaktadır, buna ise Mastix T.K. (Sakız) ismi verilmektedir [9].

Tablo 1. *P. lentiscus*'un taksonomik sınıflandırılması

Alem (Kingdom)	Plantae
Altalem (Subkingdom)	Tracheobionta
Bölüm (Division)	Magnoliophyta
Sınıf (Class)	Magnoliopsida
Altsınıf (Subclass)	Rosidae
Takım (Order)	Sapindales
Aile (Family)	Anacardiaceae
Cins (Genus)	<i>Pistacia</i>
Tür (Species)	<i>Pistacia lentiscus</i> L.

Etnofarmakolojik kullanımları

Pistacia türlerinin reçine, yaprak, meyve ve toprak üstü gibi farklı kısımları geleneksel olarak çok çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. *Pistacia* türleri arasında *P. lentiscus* farklı bölgelerde kullanımı en yaygın olan ve reçinesi de 5000 yıldan beri kullanmakta olan bir tür olarak bilinmektedir [2]. 2015 yılında *P. lentiscus* reçinesi (mastik), Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından iki terapötik endikasyonla

(hafif dispeptik bozukluklar ve cilt iltihabı/küçük yaraların iyileşmesi için) geleneksel kullanıma sahip bir bitkisel tıbbi ürün olarak kabul edilmiştir [10]. Türkiye’de boğaz enfeksiyonları, astım, egzama, mide ağrısı, böbrek taşları, felç, ishal ve sarılık tedavisinde, antienflamatuvar, antimikrobiyal, ateş düşürücü ve uyarıcı olarak; Yunanistan’da mide ağrısı, hazımsızlık, mide ülseri, bağırsak bozuklukları, karaciğer iltihabı, diş hastalığı, diyabet, hiperkolesterolemi, hipertansiyon, böbrek taşı, sarılık, öksürük, boğaz ağrısı, egzama tedavisinde; İtalya’da ağız içi iltihabı, diş ağrısı, osteoartrit, bronşit, alerji, astım, ülserler, gastrointestinal bozukluklar, mikoz, hipertansiyon, kalp hastalıkları, uçuk ve enfeksiyon durumlarında ayrıca öksürük yatıştırıcı, ateş düşürücü, yara iyileştirici ve kanamayı durdurucu olarak; İspanya’da analjezik, hipertansiyon ve kalp hastalıklarında; Portekiz’de antiseptik, diş ağrısı, antiromatizmal ve hipertansiyon tedavisinde; Tunus’ta egzama, felç, boğaz enfeksiyonları, astım, hipertansiyon, kalp hastalıkları, böbrek taşları, sarılık ve gastrointestinal hastalıkların tedavisinde ayrıca antiaterojenik, idrar söktürücü, ateş düşürücü, antihepatotoksik ve antimikrobiyal olarak; Cezayir’de mide ağrısı, hazımsızlık, peptik ülser, ishal ve romatizmada; Fas ve Kuzey Afrika’da hipertansiyon, kalp hastalıkları ve diyabette; Libya’da bağışıklık sistemini uyarıcı ve antimikrobiyal olarak; Ürdün’de sarılık tedavisinde; Irak’da karın ağrısında; İran’da ise diş eti dokusu güçlendirici, ağız kokusunu giderici, beyin ve karaciğer toniği ve mide bağırsak rahatsızlıklarında kullanımının olduğu literatürde bildirilmiştir [2, 8].

Fitokimyasal içeriği

Pistacia türlerinde farklı fitokimyasal gruplardan çeşitli bileşiklerin tespit edildiği bilgisi literatürde mevcuttur. *P. lentiscus*’un ihtiva ettiği bileşiklerin dahil olduğu bu fitokimyasal gruplar temel olarak terpenoitler, fenolik bileşikler, yağ asitleri ve steroller olarak sınıflandırılabilir [2]. İçerdiği terpenoitler incelendiğinde; hidrokarbon ve oksijenli monoterpenler uçucu yağdaki ana kimyasal bileşenlerden olup hidrokarbon monoterpenler arasında ise α -pinen’in, *P. lentiscus*’un da içerisinde olduğu pek çok türün içerdiği bildirilmiştir. α -pinen’in yanı sıra limonen, terpinen-4-ol, sabinen, mirsen, verbenon, α -terpineol, linalol, *trans*-pinokarveol, β -pinen ve γ -terpinen gibi bileşiklerde *P. lentiscus*’da yer alan diğer monoterpenlerdendir. Monoterpenler ile kıyaslandığında seskiterpenlerin *Pistacia* türlerinde daha az olduğu rapor edilmektedir. Germakren-D ve β -karyofillen ise diğer seskiterpenlere kıyasla *P. lentiscus* yapraklarında daha yüksek konsantrasyonda bulunan bileşiklerdir. Bu bileşiklerin yanı sıra α -karyofillen, δ -kadinen, α -cadinol, β -bisabolen, β -burbonen, karyofillen oksit ve longifolen tanımlanan diğer seskiterpen bileşiklerdendir. *Pistacia* türlerinin içerdiği reçineler, penta ve tetrasiklik triterpen yapısındadır. *P. lentiscus* reçinesinin asidik fraksiyonlarında mastikadienonik asit, mastikadienolik asit, morolik asit, oleanolik asit ve bunların türevleri gibi triterpenler tespit edilmiştir. Ayrıca *P. lentiscus* reçinesinin nötr fraksiyonundan tirukallol, dammaradienon, β -amirin, lupeol gibi triterpenoitler de izole edilmiştir. Uçucu yağın içerdiği kannabinoid olmayan terpenoitlere örnek olarak α -pinen, mirsen, limonen, (E)- β -karyofillen ve γ -

terpinen verilebilir. Bu bileşikler “terpen süper sınıf” listesine dahil edilmektedirler. Kannabinoid olmayan terpenoitler uçucu yağda %0.05 veya daha yüksek bir orana ulaştığında, farmasötik olarak aktif olarak sınıflandırılabilen bir yağ olup yağa farmakolojik özellikler kazandırabildikleri de ifade edilmektedir [2, 8, 11-22].

P. lentiscus'da bulunan fenolik bileşikler üç ana sınıfta tanımlanmıştır. Bunlar glikoz ve kinik asidin gallik asit ve galloil türevleri; mirisetin ve kersetin glikozitlerinin olduğu flavonol glikozitleri ve delfinidin 3-*O*-glukozit ve siyanidin 3-*O*-glukozit bileşiklerini ihtiva eden antosiyanin grubudur. *P. lentiscus* yaprakları gallik asit, katesin gibi fenolik bileşikler yanında mono, di ve tri-*O*-galloil kinik asit ve monogalloil glikoz gibi galloil türevlerini de (yaprak kuru ağırlığının %7.5'i) içermektedir. *P. lentiscus* yapraklarının toplam polifenol miktarının %20'sinin mirisetin türevlerinden oluştuğu tespit edilmiştir. 1,2,3,4,6-pentagalloil glikoz ve gallik asit bitkinin meyvelerinde bulunurken, siyanidin-3-*O*-glukozit ve delfinidin-3-*O*-glukozit bitkinin hem meyvelerinden hem de yapraklarından izole edilmiştir [2, 8, 23-27]. *Pistacia* türlerinin meyvelerinin yağ oranı %32.8-45.0 arasında değişmektedir. Meyvelerin olgunlaşması sırasında oleik asit miktarında artış, linoleik asit miktarında da azalma tespit edilmiştir. *P. lentiscus* meyvelerinde en çok bulunan sterol; β -sitosterol olup, bunu kampesterol, Δ^5 -avenasterol, stigmasterol, brassikasterol ve kolesterol takip etmektedir. Bunlara ek olarak meyvelerden elde edilen yağda oleik asit ve linolenik asit gibi tekli doymamış omega-3 yağ asitleri ve β -sitosterol gibi yüksek miktarda fitosteroller bulunduğu bildirilmektedir. Tüm bu bileşikler dışında *P. lentiscus* ve *P. lentiscus* var. *chia* yapraklarında α - tokoferol varlığı da tespit edilmiştir [2].

Farmakolojik etkileri

Antioksidan Aktivite

Abdelwahed ve ark., *P. lentiscus* meyvelerinden elde ettikleri gallik asit ve 1,2,3,4,6-pentagalloil glukoz bileşiklerinin 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürücü ve lipit peroksidasyonu inhibe edici etkilerden sorumlu olabilecekleri sonucuna varmışlardır [25]. Chryssavgi ve ark. *P. lentiscus* bitkisinin toprak üstü kısmından hareketle hazırladıkları ekstraktların, DPPH radikal süpürücü ve demir iyonu indirgeyici antioksidan gücü (FRAP) deneylerinde antioksidan kapasitesini değerlendirmişler ve bitkiden elde ettikleri uçucu yağı GC-MS ile analiz etmişlerdir. Yapılan deneyler sonucunda *P. lentiscus*'un umut verici doğal antioksidan kaynaklardan birisi olduğu ve en güçlü antioksidan aktivitenin çiçeklenme döneminde en yüksek yüzdelerle ulaşan monoterpenlerden kaynaklanabileceği ifade edilmiştir [19]. Benhammou ve ark. bitkinin yaprak etanol ekstresinin, indirgeme gücü ve süperoksit anyon radikal süpürücü etkilerini test ederek antioksidan potansiyelini değerlendirdikleri bir çalışma yapmışlardır. Deney sonucunda güçlü bir indirgeme gücü ve zayıf bir süperoksit anyon radikali süpürücü etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır [28]. Sakagami ve ark. *P. lentiscus*'un gövdesinden ve yapraklarından elde edilen reçineli bir eksuda olan Mastik'in hidroksil radikali süpürücü aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir [29]. Bhourri ve ark. meyvelerden elde

ettikleri digallik asitin lipit peroksidasyonunu %68 ve 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-sülfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS) radikalini de %99 oranında inhibe etmesinden dolayı meyvelerin önemli serbest radikal süpürücü etkinliğe sahip olduğu sonucuna varmışlardır [27]. Remila ve ark. bitkinin meyve ve yapraklarından hareketle sulu etanollü ekstraların ve alt fraksiyonların antioksidan aktivitesini değerlendirmişlerdir. Yaprak ve meyve ham ekstraları ORAC (oksijen radikal absorpsiyon kapasitesi) testinde güçlü antioksidan aktivite sergilemiştir [30]. Bouyahya ve ark. ise yaprak ve meyve uçucu yağlarının antioksidan aktivitesini ABTS, FRAP ve DPPH testleri ile belirlemişlerdir. Meyve uçucu yağının sırasıyla DPPH, FRAP ve ABTS testlerindeki IC₅₀ değerleri sırasıyla 29.64 ± 3.04 µg/mL, 38.57 ± 4.22 µg/mL ve 73.80 ± 3.96 µg/mL olup bu değerlerin yaprak uçucu yağının IC₅₀ değerlerinden düşük olduğu, sonuç olarak meyvenin daha güçlü antioksidan aktivitesi olduğunu tespit etmişlerdir [31]. *P. lentiscus* yapraklarının ana bileşenlerinin DPPH radikali ve ksantin oksidaza karşı antioksidan potansiyelinin deneysel yöntemler ve moleküler doking ile değerlendirildiği bir çalışmada, fraksiyonlama sonucunda elde edilen üç alt ekstrenin iyi antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Yaprakta bulunan digalloilkinik asit, gallokateşin ve mirisetin-3-O-ramnozid gibi ana bileşiklerin, Docking skorları değerlendirildiğinde allopurinolden daha aktif olduğu tespit edilmiştir [32]. Barbouchi ve ark. *P. lentiscus* ekstresinin ve izole ettikleri şikimik asidin DPPH radikal süpürücü etkisini inceleyerek antioksidan kapasitesini test ettiklerinde, *P. lentiscus*'un şikimik asit kaynağı olduğu fakat ekstrenin antioksidan aktiviteden sorumlu bileşiğinin şikimik asit olmadığı ifade edilmiştir [33].

Antimutajenik Aktivite

Douissa ve ark. *P. lentiscus* yapraklarından elde edilen uçucu yağın *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu ile AMES testinde aflatoksin B1 (AFB1) nedenli mutajenite üzerinde önemli bir inhibitör etki gösterdiğini bildirmişlerdir [34]. Hayder ve ark. yapraklardan elde edilen ekstraların ve uçucu yağın antimutajenik aktivitesini değerlendirmişlerdir. Yaprak ekstralarının hem dolaylı (AFB1) hem de doğrudan (Sodyum azit) etkili mutajenlere karşı antimutajenik etkili olduğunu tespit etmişlerdir [35]. Abdelwahed ve ark. da yine meyveden izole edilen gallik asit ve 1,2,3,4,6-pentagalloil glukoz bileşiklerinin *E. coli* PQ37 ile SOS kromotesti ve K562 hücre hattında Comet testi kullanarak antimutajenik aktivitesini değerlendirmişlerdir. Gallik asitin, gen ekspresyonlarını modüle ederek DNA onarım enzimlerinin aktivitesini doğrudan etkileyip antimutajen olarak hareket ettiği ve test sistemine pentagalloil glukoz eklendiğinde DNA onarımı ile ilgili genlerin eksprese edilmediği ve Comet testi sonucunda pentagalloil glukozun antigenotoksik aktiviteye sahip olmadığı görülmüştür. Ayrıca, bu iki bileşiğin, nifuroksazit ve AFB1 mutajenitesine karşı inhibitör aktivite oluşturdukları ifade edilmiştir [25]. Bhourri ve arkadaşları ise *P. lentiscus* meyvelerinden elde ettikleri digallik asidin *Escherichia coli* PQ37 suşu varlığında SOS kromotest bakteriyel test sistemi ile nitrofurantoin ve B[α]P kaynaklı genotoksositeye karşı inhibitör bir aktivite sergilediğini rapor etmişlerdir [27].

Antimikrobiyal ve Antiviral Aktivite

Marone ve ark., *P. lentiscus*'dan elde edilen reçine yapısındaki mastik sakızının *Helicobacter pylori*'nin klinik izolatlarına karşı antibakteriyel aktivitesini değerlendirmişlerdir. Mikrodilüsyon yöntemi ile minimum bakterisidal konsantrasyonlar (MBC'ler) hesaplanmıştır. Mastik sakızı, 125 µg/mL konsantrasyonda test edilen suşların %50'sini ve 500 µg/mL konsantrasyonda %90'ını öldürmüştür. Mastik sakızının alt MBC'lerinin *H. pylori* morfolojileri üzerindeki etkisi, transmisyon elektron mikroskobu ile değerlendirildiğinde reçinenin *H. pylori* hücrelerinde kabarcıklanma, morfolojik anormallikler ve hücresel parçalanmaya neden olduğu sonucuna varılmıştır [36]. *P. lentiscus* yapraklarından elde edilen uçucu yağın altı farklı bakteri suşuna (*S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* ve *Enterococcus faecalis*) karşı etkilerinin test edildiği bir çalışmada, yaprak uçucu yağının 30 µg/mL minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) değeri ile *S. enteritidis* ve *S. aureus*'a karşı dikkate değer bir aktivite gösterdiği görülmüştür. 150 µg/mL MİK değeri ile *S. typhimurium*'a karşı daha zayıf antibakteriyel etki gösterdiği ve diğer suşlara karşı da önemli bir inhibitör aktivite gösteremediği ifade edilmiştir [34]. Hayder ve ark. ise *P. lentiscus* yapraklarından elde edilen ekstraktın ve uçucu yağın antibakteriyel aktivitesini altı farklı bakteri suşuna karşı değerlendirmişlerdir. *S. typhimurium*'a karşı belirgin bir inhibitör etki gözlenirken, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *S. enteritidis*'e karşı daha zayıf aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Uçucu yağ ise *S. typhimurium*, *S. enteritidis* ve *S. aureus*'a karşı güçlü antimikrobiyal etkiler göstermiştir [35]. Koutsoudaki ve arkadaşları, *P. lentiscus* var. *chia* uçucu yağının ve on iki bileşeninin antibakteriyel aktivitesini disk difüzyon yöntemi kullanarak inceledikleri çalışmada, uçucu yağın antibakteriyel aktivitesine verbenon, α -terpineol ve linalol gibi bileşiklerin önemli ölçüde katkıda bulunduğu görülmüştür. Bu bileşiklere, test edilen farklı bakterilerin (*E. coli*, *S. aureus* ve *Bacillus subtilis*) farklı duyarlılıklar göstermesinin, yağın antibakteriyel etkinliğine sinerjik olarak çalışan bir dizi bileşenin neden olabileceği yorumu yapılmıştır [17]. Benhammou ve ark., bitkinin yaprak etanol ekstresinin antimikrobiyal aktivitesini sekiz bakteri, beş küf ve maya mantarına karşı test etmişlerdir. Çalışma sonucunda ekstrenin güçlü bir antifungal fakat zayıf bir antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir [28]. Sakagami ve ark. bitkinin gövdesinden ve yapraklarından elde edilen reçineli bir eksuda olan Mastik'in anti-HIV aktivitesini değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda katı ve sıvı mastik formlarının herhangi bir anti-HIV aktiviteye sahip olmadığı bildirmiştir [29]. Dabos ve ark., *H. pylori* enfeksiyonu olan hastalarda mastik sakızının *H. pylori* eradikasyonu üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Randomize olarak yapılan çalışmada 14 gün boyunca günde üç kez mastik sakızından 350 mg tüketen bazı hastalarda patojenin yok edildiği ve tüm hastaların hiçbir ciddi yan etki bildirmeksizin reçineyi iyi bir şekilde tolere ettiği ifade edilmiştir. Bunun yanı sıra reçinenin *in vivo* yöntemlerle test edilerek bakterisidal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [37]. Paraschos ve ark. ise *P. lentiscus* var. *chia* reçinesinin distilasyonu ile elde edilen yağ altı suyunun antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmişler ve

yağ altı suyunun *E. coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Candida* türlerinin klinik izolatları ve gıda kaynaklı suşlar üzerinde antimikrobiyal aktivitesi olduğunu bildirilmişlerdir. Linalol ve α -terpineol'un en güçlü antimikrobiyal bileşenler olduğu da ifade edilmiştir [21]. Mharti ve ark., Fas'tan topladıkları *P. lentiscus* yapraklarından elde ettikleri uçucu yağın antimikrobiyal aktivitesini inceledikleri bir çalışma yapmışlardır. Çalışma neticesinde uçucu yağların *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı güçlü bir antimikrobiyal aktivite sergilerken, *P. aeruginosa* karşı herhangi bir aktivite gösteremediği bildirilmiştir [38]. Bouyahya ve ark., *P. lentiscus* yaprak ve meyve uçucu yağlarının antibakteriyel aktivitesini altı farklı bakteri suşuna karşı değerlendirmişlerdir. Meyve uçucu yağının, *P. aeruginosa*'ya karşı en düşük MİK değerini gösterdiği görülmüştür [31]. Bouslama ve ark., bitkinin yaprak, gövde ve tohum kısımlarından değişik polaritedeki solvanlardan hazırladıkları ekstraların *Herpes simplex* virüs tip 2 (HSV-2), Coxsackievirus tip B3 ve adenovirüs tip 5'e karşı antiviral aktivitesini araştırmışlardır. Sadece gövde metanol ekstresinin, HSV-2'ye karşı önemli bir antiviral aktivite gösterdiği gözlenmiştir [39]. Milia ve ark., *P. lentiscus* uçucu yağının çeşitli periodontal bakterilere ve *Candida* türü mantarlara karşı olan antimikrobiyal aktivitesini değerlendirdikleri çalışmada periodontal bakterilere karşı MİK değerlerinin, 3.13 ile 12.5 $\mu\text{g/mL}$ arasında; *Candida* türlerine karşı ise 6.25 ile 12.5 $\mu\text{g/mL}$ arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Uçucu yağ bu etkiyi gösterirken ağız içi hücrelere de herhangi bir yan etki göstermediği görülmüştür [40]. Dhieb ve ark. ise meyvelerden elde edilen yağın antibakteriyel ve antifungal aktivitelerini araştırmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda meyve yağının *S. aureus* ve *P. aeruginosa* karşı çok güçlü antibakteriyel, *C. parapsilosis*'e karşı da güçlü antifungal aktivitesinin olduğu ifade edilmiştir [41]. Alhadad ve ark. agar difüzyon yöntemi kullandıkları çalışmalarında, *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'a karşı test edilen; *P. lentiscus* yaprak aseton ekstresinin tüm konsantrasyonlarının farklı inhibisyon zon değerlerine sahip olarak, antibakteriyel aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir [42].

Antienflamatuvar Aktivite

Kaliora ve ark., Aktif Crohn hastalığı (CD) olan hastalarda mastik uygulamasının hastalığın klinik seyir ve plazma enflamatuvar mediatörleri üzerindeki etkinliğini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar hafif ila orta derecede CD olan hastalarda *P. lentiscus* reçinesinin 4 haftalık tedavi süreci sonunda CD aktivite indeksinde ve plazma enflamatuvar mediatörlerinde herhangi bir yan etki olmaksızın önemli bir azalmaya neden olduğunu ve Tümör nekroz faktör- α (TNF- α)'yı önemli ölçüde inhibe ettiğini belirtmişlerdir [43]. *P. lentiscus* var. *chia* reçine ekstresinin ve ondan izole edilmiş olan tirukallol'un insan aort endotel hücreleri üzerinde antienflamatuvar aktivite gösterdiği ve TNF- α ile uyarılan insan aortik endotel hücrelerinde adezyon moleküllerinin ekspresyonu üzerinde önemli inhibitör aktiviteye neden olduğu görülmüştür [44]. Triantafyllou ve ark.nın *P. lentiscus* var. *chia* reçinesinin antienflamatuvar aktivitesinin moleküler mekanizmasını ve antioksidan aktivitesinin potansiyel rolünü değerlendirdikleri çalışmada, reçinenin antienflamatuvar aktivitesinin NADPH oksidaz tarafından

süperoksit ve H₂O₂ üretiminde azalmaya neden olan protein kinaz C'nin inhibisyonu ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür [45]. Maxia ve ark. ise *P. lentiscus* uçucu yağının topikal antienflamatuvar aktivitesini, karragenan kaynaklı sıçan pençe ödemi ve pamuk pellet nedenli granülom modelini kullanarak incelemişlerdir. Uçucu yağın pamuk pelet yerleştirilmiş sıçanlardaki serum TNF- α ve interlökin-6 (IL-6) üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Topikal uygulamada uçucu yağ, pençe ödeminde önemli bir azalmaya neden olmuştur. Uçucu yağ ayrıca pamuk pelletinin neden olduğu granülomu inhibe etmiştir ve serum TNF- α ve IL-6 seviyelerini azaltmıştır. Araştırmacılar *P. lentiscus* uçucu yağının hasarlı dokuya lökosit göçünü azalttığı ve antienflamatuvar aktivite sergilediği sonucuna varmışlardır [46]. *P. lentiscus* reçinesinin dört farklı dozunun (50, 100, 200 ve 300 mg/kg/gün) trinitrobenzen sülfonik asitle kolit oluşturulmuş sıçanlara oral yoldan uygulanarak test edildiği bir çalışmada, 100 mg/kg/gün dozda uygulama yapılan sıçanlarda tüm enflamatuvar sitokinlerin azaldığı, 50 mg/kg/gün dozda reçine uygulanan sıçanlarda ve ayrıca kortizon tedavisi ile (25 μ g/kg/gün) sadece İntrasellüler Adezyon Molekülü-1 seviyesinin azaldığı belirtilmiştir. Araştırmacılar *P. lentiscus* reçinesinin CD'nda oksidan/antioksidan dengesini düzenleyebileceğini ve enflamasyonu modüle eden bir terapötik rolünün olabileceğini vurgulamışlardır [47]. Remila ve ark., *P. lentiscus* bitkisinin meyve ve yapraklarından hareketle hazırlanan sulu etanolü ekstraktların ve alt fraksiyonlarının antienflamatuvar aktivitesini değerlendirmişlerdir. Antienflamatuvar aktivite, ATP veya H₂O₂'ye maruz kalan makrofajlar tarafından salınan interlökin-1 β seviyeleri ölçülerek incelenmiştir. Yaprak ekstresinin (100 μ g/mL), asetilsalisilik asit ile karşılaştırıldığında önemli bir antienflamatuvar aktivite gösterdiği görülmüştür. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar bitkinin geleneksel kullanımını desteklemiştir [30]. Milia ve ark. *P. lentiscus* uçucu yağının antienflamatuvar aktivitesini değerlendirdikleri çalışmada siklooksijenaz (COX-1/2) ve lipoksijenaz (LOX) enzim inhibisyon yöntemlerini kullanmışlardır. COX-1/2 ve LOX oksidasyonları, yağ tarafından sırasıyla %80 ve %20 μ g/mL konsantrasyonlarda inhibe edilmiş ve yağın COX-2 ve LOX enzimlerine karşı ikili bir inhibitör etkiye sahip olduğu düşünülmüştür [40]. Santarsiero ve ark., *P. lentiscus* uçucu yağının eldesinden sonraki kalan hidrosolün antienflamatuvar aktivitesini değerlendirmişlerdir. Araştırma sonucunda sitrat yolunun iki ana bileşeninin *P. lentiscus* hidrosolü ile aşağıya regüle edildiği tespit edilmiştir. Bu nedenle, enflamatuvar araçlar olan Reaktif Oksijen Türleri (ROS), Nitrik oksit (NO) ve prostaglandin E2 (PGE2) seviyelerinin azaldığı ifade edilmiştir [48]. *P. lentiscus* yapraklarının sulu ekstresinin (50, 100 ve 200 mg/kg, oral) Dekstran Sülfat Sodyum nedenli akut kolit modelinde antienflamatuvar etkisi incelenmiş ve bulgular ekstrenin proinflamatuvar mediatörlerin (NO, IL-6 ve TNF- α) seviyelerinde önemli bir azalmaya neden olduğu işaret edilmiştir [49]. Liu ve arkadaşları *P. lentiscus*'dan elde edilen tirukalan triterpenoitlerin antienflamatuvar aktivitesini incelemişlerdir. Yapılan antienflamatuvar aktivite çalışmaları sonucunda sakızdan izole edilen (3S)-3-asetoksi-7-okso-tirukalla-8,24Z-dien-26-oik asit, (3S, 7R)-3-asetoksi-7-hidroksi-11-okso-tirukalla-8,24Z-dien-26-oik asit, mastikinoik asit A ve 3,7-diokso-8,24Z-tirukalladien-26-oik asitlerin

pozitif kontrol deksametazondan ($IC_{50} = 19.5 \mu M$) daha güçlü ($IC_{50} = 7.7-13.4 \mu M$) NO inhibisyonuna neden oldukları tespit edilmiştir [50].

Gastrointestinal Hastalıklar Üzerindeki Etkileri

Dabos ve ark., *P. lentiscus* var. *chia*'dan elde edilen reçineli bir eksuda olan sakızın fonksiyonel dispepsisi olan hastalardaki etkinliğini değerlendirmişlerdir. Fonksiyonel dispepsi için yüz kırk sekiz hasta, günde üç kez 350 mg sakız veya plasebo almak üzere rastgele gruplandırılmıştır. 3 haftalık tedaviden sonra fonksiyonel dispepsi semptomlarının şiddeti başlangıca göre dispepsi indeksi kullanılarak değerlendirilmiştir. Tedaviden sonra semptom skoru, sakız alan grupta plasebo grubuna göre önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur. Ayrıca plasebo alan hastaların %40'ında ve sakız alan hastaların %77'sinde semptomlarda belirgin bir iyileşme gözlenmiştir. Araştırmacılar *P. lentiscus* sakızının plaseboya kıyasla fonksiyonel dispepsili hastalarda semptomları önemli ölçüde iyileştirdiği sonucuna varmışlardır [51]. Rahimi ve ark. aralarında *P. lentiscus* reçinesinin de olduğu ve Magliasa adını verdikleri geleneksel bir İran formülasyonunun deneysel kolit üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Erkek sıçanlarda kolit modeli 2,4,6-trinitrobenzensülfonik asit (TNBS) ile oluşturulmuştur. Tedavi periyodunun ardından sıçan kolit modelinde *P. lentiscus* reçinesini içeren bu formülasyonun kolon hasarında ve hastalığın patofizyolojisi ile ilgili biyokimyasal belirteçlerin seviyelerinde önemli azalmaya neden olduğu ifade edilmiştir [52]. Naouar ve ark., *P. lentiscus*'dan soğuk sıkım yoluyla elde ettikleri yağların deneysel kolit modeli üzerindeki antienflamatuvar etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar *P. lentiscus* yağının özellikle genç yaşta profilaktik olarak uygulandığında, sıçanlarda TNBS nedenli kolit modelinde bağırsak iltihabı üzerinde koruyucu bir etki sağlayabileceğini ifade etmişlerdir [53]. Rostamani ve Semnani, Fars geleneksel tıbbında kullanılan içerisinde *P. lentiscus*'unda olduğu Sahj isimli bitkisel karışımının 42 yaşında bir erkek hastada ülseratif kolit üzerindeki olgu sunumunu paylaşmışlardır. Sahj tableti ile 18 günlük geleneksel tedaviden sonra, bağırsak hareketlerinin sıklığında artış (günde iki kez), şişkinlik, kramp veya karın ağrısı olmaması ve normal kansız dışkıının parametre olarak değerlendirildiği ülseratif kolit semptomlarında önemli bir iyileşme olduğu ifade edilmiştir [54]. Barimani ve ark., içerisinde *P. lentiscus*'unda olduğu Jalinous® isimli kapsülün kabızlık üzerindeki etkisini çift kör klinik bir çalışma ile değerlendirmişlerdir. Araştırma sonucunda Jalinous® kapsülünün yetişkinlerde fonksiyonel kabızlık için etkili ve güvenli bir tedavi olduğu ancak kesin sonuçlara varmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu ifade edilmiştir [55]. Kakagia ve ark. ise *P. lentiscus* var. *chia* reçinesinin sıçan mide ve kolon mukozasında soğuk kısıtlama stresinin (CRS) etkilerine karşı olan aktivitesini, gastritin önlenmesi ve tedavisinde kullanılan standart bir ilaç olan omeprazol ile karşılaştırmak suretiyle değerlendirmişlerdir. Yapılan çalışmada reçinenin, CRS'ye karşı peptik mukozayı koruyucu özelliklere sahip, antienflamatuvar ve antioksidan etkiler gösteren umut verici bir kaynak olduğu ifade edilmiştir [56].

Hepatoprotektif, Antiaterosklerotik ve Antidiyabetik Aktivite

Janakat ve ark., içlerinde *P. lentiscus*'un sulu ekstresinin de olduğu çeşitli ekstrelerin hepatoprotektif etkisini sıçanlarda karbon tetraklorür (CCl₄) nedenli karaciğer toksisitesi modeli üzerinde değerlendirmişlerdir. Deney sonucunda *P. lentiscus*'un sulu ekstresinin üç enzimin (alkalen fosfataz (ALP), serum glutamik oksaloasetik transaminaz (SGOT), serum glutamik piruvik transaminaz (SGPT)) aktivitesini ve bilirubin seviyelerini azaltarak CCl₄ nedenli hasara karşı belirgin bir antihepatotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [57]. Maameri ve ark., *P. lentiscus* yağının CCl₄ uygulanan sıçanlardaki hepatoprotektif etkisini değerlendirmişlerdir. Yapılan araştırma sonucunda hepatotoksiteyi önlemek için *P. lentiscus* yağının 2 mL/kg dozunda kullanımının SGPT enzim seviyesini önemli ölçüde azaltarak kısmi aktiviteye neden olduğu fakat 5 mL/kg dozun hem SGPT hem de SGOT enzim seviyelerini önemli ölçüde yükselterek hepatik değişiklikleri şiddetlendirdiğini ifade etmişlerdir [58]. Ljubuncic ve ark. tiyoasetamit nedenli karaciğer hasarı modelinde *P. lentiscus*'un kurutulmuş yapraklarından hazırlanan sulu ekstrenin (15 ve 75 mg/kg) etkinliğini değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda araştırmacılar, sağlıklı sıçanlarda uzun süreli (5 hafta) sulu yaprak ekstresi uygulamasıyla hepatik fibroz, hafif kolestaz ve indirgenmiş glutatyon havuzunda tükenme olduğunu bildirmişlerdir [59]. Mehenni ve ark. *P. lentiscus* yaprak ve meyve ekstrelerinin farelerde parasetamol nedenli akut hepatit modelindeki etkisini ve ekstrelerin streptozotosin (STZ) nedenli diyabetik sıçanlardaki antidiyabetik aktivitesini inceledikleri bir çalışma yapmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda 125 mg/kg dozda yaprak veya meyve ekstresinin ya da her ikisinin kombinasyonunun parasetamol toksisitesine karşı hepatoprotektif bir potansiyele sahip olduğu ALP, SGPT ve SGOT ve toplam bilirubin seviyelerindeki değişimler ölçülerek tespit edilmiştir. *P. lentiscus* yaprak ekstresi, STZ-nedenli diyabetik sıçanlarda, referans ilaç glibenklamide benzer bir şekilde umut verici bir antidiyabetik aktivite sergilemiştir, bu sonuç, *in vitro* α -amilaz inhibisyonu ile doğrulanarak desteklenmiştir [60]. Rehman ve arkadaşları, alloksan nedenli diyabetik sıçan modelinde *P. lentiscus* sakızının anti-diyabetik etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda 100 mg/kg dozda *P. lentiscus* sakızının kontrole kıyasla kan şekerinde önemli ölçüde azalmaya neden olduğu görülmüştür. Tüm bulgular gözönüne alındığında ise *P. lentiscus* sakızının antidiyabetik ve hepatoprotektif etkilere sahip olduğu yorumu yapılmıştır [61]. Vuorinen ve arkadaşları, 11 β -hidroksisteroit dehidrojenaz 1 inhibitörleri için doğal ürün veritabanını oluşturmak adına farmakofor tabanlı bir sanal tarama çalışması yapmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda 11 β -hidroksisteroit dehidrojenaz 1'in *P. lentiscus* sakızı ile inhibe edildiği ve bu inhibisyonun sakızın antidiyabetik aktivitesine katkı verdiğini düşünmüşlerdir [62]. Ammari ve ark.'nın *P. lentiscus* yağının hepatoprotektif etkisini incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada, *P. lentiscus* yağının lipopolisakkarit (LPS) nedenli karaciğer toksisite modelinde sıçan karaciğerindeki oksidatif stresi önleyerek hepatoprotektif aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir [63]. Dedoussis ve ark., *P. lentiscus* reçinesinin antiaterojenik aktivitesini araştırmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda *P. lentiscus*

reçinesinin, CD36 mRNA ekspresyonunu aşağı regüle ederek antiaterojenik etki gösterebileceği sonucuna varılmıştır [64]. Djerrou ve ark., hiperlipidemik diyet uygulanan tavşanlarda *P. lentiscus* meyve yağının antihiperlipidemik aktivitesini değerlendirmişler ve meyve yağının toplam kolesterol, LDL-kolesterol ve trigliserit seviyelerini azaltarak anti-hiperlipidemik etki gösterdiği sonucuna varmışlardır [65]. Triantafyllou ve ark. tarafından yapılan bir klinik çalışmada ise 50 yaş üstü toplamda 133 kişiden oluşan denekler yüksek doz ve düşük doz *P. lentiscus* sakız çözeltisi alanlar şeklinde 2 gruba ayrılmışlardır. Serum biyokimyasal parametreleri yüksek doz grubunda 18 ay ve düşük doz grubunda ise 12 ay süresince takip edilmiştir. Araştırma sonucunda yüksek doz grubunda serum total kolesterol, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), total kolesterol/yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) oranı, lipoprotein (a), apolipoprotein A-1, apolipoprotein B, SGOT, SGPT ve gama glutamil transferaz (GGT) değerlerinde düşüş gözlenirken; düşük doz grubunda ise erkeklerde glikoz seviyelerinin azaldığı, kadınlarda serum glukoz seviyelerinin değişmediği bildirilmiştir [66].

Antiparaziter Aktivite

Azaizeh ve ark., *P. lentiscus* polifenollerinin antihelminetik aktivitelerini larva dış kılıfı inhibisyonu (LEIA) deneyi ile test etmişlerdir. Bulgular, tanen bakımından zengin bitki ekstraktlarının, konakçı istilasının çok erken aşamasına müdahale ettiğini ve yüksek konsantrasyonda galloillenmiş türevlerinin antihelminetik aktiviteden sorumlu olabileceğini düşündürmüştür [67]. Ezz Eldin ve ark., *P. lentiscus* reçinesinin *Trichomonas vaginalis* trofozoitleri üzerindeki etkilerini *in vitro* olarak araştırmışlardır. Sonuçlar, reçinenin *T. vaginalis* trofozoitlerinin büyümesinin inhibisyonuna neden olduğunu göstermiştir. Çalışmada, reçinenin Trichomoniasis tedavisi için umut verici fitoterapötik ajan olabileceği önemle vurgulanmıştır [68]. Saric ve ark., doğal olarak enfekte olmuş koyunlarda *P. lentiscus*'un da olduğu tanen bakımından zengin bitkilerin antihelminetik etkilerini değerlendirmişlerdir. Tedavi edilen ve kontrol grubu hayvanları arasında dışkı yumurta sayısında anlamlı bir fark görülmediği ifade edilmiştir. Ayrıca bu bitkilerin kombinasyonunun gastrointestinal nematodlar (GIN) için antiparaziter etki gösteremedikleri belirtilmiştir [69]. Bouyahya ve ark., *P. lentiscus* yaprak ve meyve uçucu yağlarının parazit önleyici aktivitesini değerlendirdikleri çalışmada ise antiparaziter etkiyi MTT yöntemi kullanarak üç *Leishmania* türüne (*Leishmania infantum*, *Leishmania major* ve *Leishmania tropica*) karşı test etmişlerdir. *L. major*'a karşı yaprak uçucu yağı ($IC_{50} = 17.52 \pm 1.26 \mu\text{g/mL}$) meyve uçucu yağından ($IC_{50} = 21.42 \pm 2.92 \mu\text{g/mL}$) daha iyi bir sitotoksik aktivite gösterirken; *L. infantum*'a karşı meyve uçucu yağı ($IC_{50} = 0.8 \pm 0.83 \mu\text{g/mL}$), yaprak uçucu yağından ($IC_{50} = 11.28 \pm 1.63 \mu\text{g/mL}$) daha yüksek sitotoksik aktivite göstermiştir [31]. Maaroufi ve ark., *P. lentiscus*'tan elde edilen uçucu yağın *L. major* amastigotlarına karşı *in vitro* antileishmanial ve sitotoksik aktivitelerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda uçucu yağın, makrofajlara karşı toksik etki ve antileishmanial aktivite sergilediği görülmüştür [70]. Oliveira ve ark., pek çok bitki ekstresinin *in vitro* antihelminetik aktivitesini inceledikleri çalışmada, Yumurta Kuluçka İnhibisyon Testi ile antihelminetik etkiden kısmen de olsa

polifenollerin sorumlu olabileceklerini göstermişlerdir. *P. lentiscus* bitkisinin de antihelmintik etkili bileşikler yönünden zengin olduğu tespit edilmiş ve bu nedenle, geniş getiren hayvanlarda GIN'lara karşı nutrasötik olarak veya fitoterapötik uygulamalar için değerlendirilebileceği ifade edilmiştir [71].

Antitümör ve İmmün Sistem Üzerindeki Aktiviteleri

Kaliora ve ark. *P. lentiscus* bitkisinden elde edilmiş sakızın CD olan hastaların dolaşımında bulunan mononükleer hücrelerin sitokin üretimi üzerindeki etkisini inceledikleri bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda sakızın periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) üzerinde immünomodülatör etkiye sahip olduğu, TNF- α inhibitörü ve Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktör uyarıcısı olarak hareket ettiği tespit edilmiştir [72]. He ve ark., prostat kanseri hücrelerinde *P. lentiscus* reçinesinin maspin serin proteaz inhibitörü etkisi, antitümör etkisi ve anjiyogenez inhibitörü olduğu bilinen maspin ekspresyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek üzere yaptıkları çalışmalarda, reçinenin maspin mRNA ve protein ekspresyonuna neden olduğu, maspin promotör aktivitesini arttırdığını, ayrıca androjene duyarlı element bağlanma aktivitesini inhibe edip maspin promotöründe Sp1 bağlanma aktivitesini arttırdığını tespit etmişlerdir [73]. He ve ark. *P. lentiscus* reçinesinin androjenden bağımsız prostat kanseri (PC-3) hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini incelemek ve nükleer faktör κ B (NF- κ B) sinyalini hedef alarak bu sistemde yer alan mekanizmaları araştırmak amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda *P. lentiscus* sakızının NF- κ B aktivitesini ve NF- κ B sinyal yolunu baskılayarak PC-3 hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği ve hücre döngüsünün ilerlemesini bloke ettiği ifade edilmiştir [74]. Sakagami ve ark. tarafından *P. lentiscus* sakızının fibroblastlara karşı sitotoksik etkisinin ve oral polimorfonükleer lökositlerin hücre ölümü üzerindeki inhibitör etkisinin değerlendirildiği çalışmada, sakızın 13 hücre hattı arasında promiyelositik lösemi hücre hattında en güçlü sitotoksik etkiyi gösterdiği ve ayrıca oral polimorfonükleer lökositlerin doğal apoptozunu inhibe ettiğini ifade etmişlerdir [29]. Dimas ve ark., *P. lentiscus* sakızından hazırlanmış hekzan ekstresinin insan kolon tümör hattında (HCT116) antikanser aktivitesini araştırmışlardır. 200 mg/kg dozda intraperitoneal olarak uygulanan sakız ekstresinin 35 günün sonunda yan etkiler olmaksızın tümör büyümesini yaklaşık %35 oranında inhibe ettiği ve insan kolorektal kanserine karşı antitümör aktivitesine sahip olduğu görülmüştür [75]. Magkouta ve arkadaşları *P. lentiscus* var. *chia*'dan elde edilen sakız yağının (45 mg/kg vücut ağırlığı, intraperitoneal olarak, haftada 3 kez ~3 hafta), subkütan olarak Lewis akciğer karsinoma hücresi inoküle edilmiş C57BL/6 farelerde toksisite olmaksızın tümör büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiğini (tümör hacimlerinde %56.4 \pm 5.7 maksimum azalma) göstermişlerdir. *In vitro* çalışmada ise sakız yağı, vasküler endotelial büyüme faktörünü ve Lewis akciğer karsinomu hücreleri tarafından kemokin salınımını azaltmıştır. Sakız yağı uygulaması küçük guanozin trifosfatazlar Ras, RhoA ve NF- κ B'ye bağlı raportör gen ekspresyonunu *in vivo* ve *in vitro* azaltmıştır ve bu sonuç sakız yağı aktiviteleri ile ilgili sinyal ve transkripsiyon yollarının bloke edilmesi arasında mekanik bir bağlantı olduğunu göstermiştir [76]. *P. lentiscus* sakızının sıçanlarda karaciğer

kanseri üzerindeki etkilerini araştırmak için sıçanlarda karaciğer tümörü oluşturulduktan sonra diyetlerine 0.01, 0.1 ve %1 oranında sakız eklenmiş ve 6 hafta süresince bu diyetle beslenmeleri sağlanmıştır. Sakızın yüksek dozlarda sıçan karaciğerinde preneoplastik lezyon gelişimini desteklediğini ve artan karaciğer nispi ağırlığı ile bu sakızın arzu edilen antikanserojenik etkilerinin nispeten düşük dozlarda görülebileceği sonucuna varılmıştır [77]. Remila ve ark., *P. lentiscus* bitkisinin meyve ve yapraklarının sulu etanollü ekstresi ve alt fraksiyonlarının antikanser aktivitelerini, melanoma (B16F10) ve meme (EMT6) karsinoma hücre hatlarında değerlendirmişlerdir. Yaprak ve meyve ekstrelerinin B16F10 hücrelerini sırasıyla 56.40 ve 58.04 µg/mL IC₅₀ değerleri ile inhibe ettikleri tespit edilmiştir. Bu değerlerin referans olarak kullanılan doksorubisin ve 5-fluorourasil (IC₅₀= 36.28 and 31.29 µg/mL, sırasıyla) değerlerine yakın olduğu görülürken ekstrelerin EMT6 hücre hatlarında çok da etkili olmadıkları görülmüştür [30]. Bouyahya ve ark., *P. lentiscus* yaprak ve meyve uçucu yağlarının antikanser aktivitesini, RD ve L20b Adenokarsinom hücre hatları üzerinde incelediklerinde meyve uçucu yağının RD ve L20B hücre hatları üzerinde sırasıyla 26.43 ±2.18 µg/mL ve 33.02 ± 2.84 µg/mL IC₅₀ değerleriyle dikkate değer bir sitotoksik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir [31]. *P. lentiscus* meyve sabit yağının bleomisin kaynaklı akciğer fibrozisine karşı koruyucu etkisinin ve bu korumada oksidatif stresin rolünün araştırıldığı bir çalışmada, sıçanlarda bleomisin kaynaklı akciğer fibrozisinde ve oksidatif stresde koruyucu bir etkisi olduğuna işaret edilmiştir [78]. Xanthis ve ark., *P. lentiscus* var. *chia* uçucu yağının ve başlıca bileşenleri olan mirsen ve α-pinenin sitoprotektif potansiyelini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda ise uçucu yağın, umut verici sitoprotektif özelliklerini dolaylı olarak antioksidan mekanizmalar yoluyla gösterebildiği ifade edilmiştir [79]. Liu ve ark. *P. lentiscus*'dan elde edilen tirukalan triterpenoitlerin sitotoksik aktivitesini incelemişlerdir. Yapılan araştırma sonucunda elde edilen bir bileşiğin HepG2 hücrelerine karşı doksorubisininkine benzer sitotoksik aktivite gösterdiği belirtilmiştir [50].

Nöroprotektif Aktivitesi

Benamar ve ark. *P. lentiscus*'un da olduğu çeşitli bitkilerin asetilkolinesteraz (AChE) inhibitör aktivitesini değerlendirdikleri bir çalışma yapmışlardır. Ellman'ın kolorimetrik yöntemine göre, *P. lentiscus*'un yaprak sulu ekstresinin (20 µg/mL) güçlü bir AChE inhibisyonuna (%62.86 ± 0.95) neden olduğu ifade edilmiştir [80]. Ammari ve ark. sıçanlarda LPS kaynaklı hafıza bozukluğu ve oksidatif hasara karşı *P. lentiscus* yağının nöroprotektif etkisini inceledikleri bir çalışma yapmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda *P. lentiscus* yağının, sıçanda LPS kaynaklı hafıza bozukluklarını tersine çevirdiği görülmüştür. Ayrıca LPS'ye maruz kalan sıçanların beyin asetilkolinesteraz aktivitesinde ve oksidatif stresteeki artışın, *P. lentiscus* yağı ile önemli ölçüde azaldığı da ifade edilmiştir [63].

Yara İyileştirici Aktivitesi

Djerrou ve ark. *P. lentiscus* yağının tavşanlarda oluşturulan deneysel yanık yarasının iyileşmesi üzerindeki etkisini değerlendirdikleri bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada dört gün boyunca 1 mL

uygulanan *P. lentiscus* yağının yara kontraksiyonunu arttırdığı ve epitelizasyon süresini kısalttığı belirtilmiştir [81]. Khedir ve ark. *P. lentiscus* meyve yağının fraksiyonel karbondioksit lazer uygulaması ile oluşturulan yanık üzerindeki iyileştirici etkisini değerlendirdikleri bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada meyve yağının etkisi referans ilaç olarak kullanılan CYTOL BASIC® ile mukayese edilerek değerlendirilmiştir. Tüm tedaviler sekiz gün boyunca topikal olarak uygulanmış ve iyileştirici etki makroskopik, histolojik ve biyokimyasal parametrelerle değerlendirilmiştir. *P. lentiscus* meyve yağı ile tedavi edilen grup hayvanlarının CYTOL BASIC® grup hayvanlarına göre yaralarının daha hızlı iyileştiği görülmüştür. Ayrıca tedavi sırasında, *P. lentiscus* meyve yağı ile tedavi edilen grubun diğer gruplara göre daha az eritem, daha az kabuklanma, daha yüksek genel yara görünümü skorları ve yüksek kolajen içeriği oluşumuna neden olduğu ifade edilmiştir [82]. Mezni ve ark. *P. lentiscus*'un yağ bazlı merheminin yaraları iyileştirme potansiyelini kobaylar üzerinde deneysel yaralar oluşturulduktan sonra Cicaderma® isimli merhem ile karşılaştırmalı olarak değerlendirmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda ise *P. lentiscus* yağ bazlı merhem, geleneksel tıptaki kullanımına uygun olarak, kayda değer yara iyileştirme aktivitesi gösterdiği ifade edilmiştir [83]. Hemida ve ark. *P. lentiscus* yaprak etanol ekstresinin (%10 ve %30'luk ekstrere) sıçanlarda yara iyileştirici aktivitesini referans bileşik olarak kullanılan Cicatril-bio®'ya karşı değerlendirmişlerdir. *P. lentiscus* yapraklarının etanollü ekstrere hazırlanan merhemler, Wistar sıçanlarının deri eksizyonlarında güçlü bir yara iyileştirici etki göstermiştir. Yapılan araştırma sonucunda *P. lentiscus* yaprak etanol ekstresinin yara kontraksiyonunu hızlandırdığı ve epitelizasyon süresini kısalttığı için yara iyileşme etkisini desteklediği ifade edilmiştir [84]. Kishimoto ve ark. *P. lentiscus* reçinesinden hareketle cilt alerjileri için önleyici ve destekleyici seçenekler geliştirmek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Bulgular, *P. lentiscus* reçinesi ile topikal tedavinin farelerde alerjik dermatit modelinde enflamatuvar ve kaşıntılı tepkileri önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir [85]. Elloumi ve ark., *P. lentiscus* yapraklarından distilasyonla elde edilmiş ekstreten elde edilen iki izole flavonoid glikozitinin; mirisetin-3-O-ramnozid (MM) ve kersetin-3-O-ramnozitin (QM), yara iyileştirici potansiyelini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda ekstre, MM ve QM'nin kollajen oluşumunu artırarak hücre çoğalmasında aracılık ettiği ve enflamatuvar belirteçleri düzenleyerek yara iyileşmesini hızlandırdığı ifade edilmiştir [86].

Kemik sağlığı üzerindeki etkisi

Pepe ve ark. *P. lentiscus* sakızının, yumurtalıkları alınmış sıçanlarda kemik mineral yoğunluğu (BMD) üzerindeki potansiyel etkisini incelemişlerdir. Araştırma sonucunda günlük sakız tüketiminin (0.83 g/kg vücut ağırlığı, 3 ve 6 ay süresince) sıçanların total ve proksimal tibia ve 6. lomber vertebraının BMD'si üzerinde vajinal epitel ve uterus üzerinde istenmeyen etkilere neden olmadan koruyucu bir etkiye sahip olduğu ve üç noktalı bükme (3pb) testi sonuçlarından da sıçan femurlarının kalınlığı üzerinde olumlu bir etki gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca sakızın sıçanların hem kas sistemi hem de intraperitoneal yağ/vücut ağırlığı oranı için faydalı olduğu belirtilmiştir [87].

Fitotoksosite

Djerrou ve arkadaşları *P. lentiscus* meyve sabit yağının tahriş edicilik potansiyeli ve subakut dermal toksisitesi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda *P. lentiscus* yağının tek bir maruziyetten sonra gözleri ve cildi minimum düzeyde tahriş ettiği, ancak kontakt dermatite ve uzun süreli kullanımdan sonra cildin geri dönüşümlü olarak kalınlaşmasına neden olabileceği ifade edilmiştir [88]. Benalia ve ark., *P. lentiscus* meyve sabit yağındaki alkilsalisilik asitlerin cildi tahriş edici etkileri olması sebebiyle üreticiler tarafından nutrasötik veya kozmetiklerde kullanıldığında yağdaki alkilsalisilik asit miktarının belirlenmesi gerektiği vurgulamışlardır [89].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu derlemede literatür verileri ışığında *P. lentiscus* türünün botanik özellikleri, etnofarmakolojik kullanımı, fitokimyasal içeriği ve farmakolojik kullanımı özetlenmeye çalışılmıştır. Tıbbi bitkiler, insan ve toplum sağlığında önemli bir rol oynamaktadır. *Pistacia* türlerinin reçine, yaprak, meyve ve toprak üstü gibi farklı kısımları geleneksel olarak çok çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Ülkelerin geleneksel tıp sistemlerinde, *P. lentiscus* türü çok çeşitli hastalıkların tedavisinde yer almıştır. *P. lentiscus* türü terpenoitler, fenolik bileşikler, yağ asitleri ve steroller yönünden zengindir. Bu türle ilgili antioksidan, antimitojenik, antimikrobiyal, antiviral, antienflamatuar, antitümör, antikolinesteraz, nöroprotektif, hepatoprotektif, antiaterosklerotik, antidiyabetik, antiparaziter aktivite çalışmaları yanısıra gastrointestinal hastalıklar üzerindeki etkileri ve yara iyileştirici aktivitesi de araştırılmıştır. Sonuç olarak, *P. lentiscus*'un birçok geleneksel kullanımı çeşitli farmakolojik araştırmalar ile doğrulanmıştır. Yapılan araştırma sonucunda *P. lentiscus* türünün çeşitli farmasötik formlarda doğal kaynaklı ilaçların geliştirilmesi ve ticarileştirilmesi için faydalı olabileceği fakat risk faktörlerini daha iyi aydınlatmak adına daha fazla prelinik ve klinik çalışmaya gereksinim olduğu sonucuna varılmıştır.

YAZAR KATKILARI

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

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Bahmani, M., Saki, K., Asadbeygi, M., Adineh, A., Saberianpour, S., Rafieian-Kopaei, M., Bahmani, F., Bahmani, E. (2015). The effects of nutritional and medicinal mastic herb (*Pistacia atlantica*). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(1), 646-653.
2. Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Salehi Surmaghi, M.H., Shams-Ardekani, M.R., Rahimi, R. (2013). Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): a review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *The Scientific World Journal*, 1-33. [CrossRef]
3. Rauf, A., Al-Awthman, Y.S., Muhammad, N., Shah, M.M., Mitra, S., Emran, T.B., Bahattab, O., Mubarak, M.S. (2021). Pharmacological Investigation of Genus *Pistacia*. P.H.El-Shemy (Ed.), *Medicinal Plants from Nature* [Working Title]. IntechOpen. [CrossRef]
4. Rauf, A., Patel, S., Uddin, G., Siddiqui, B.S., Ahmad, B., Muhammad, N., Mabkhot, Y.N., Hadda, T.B. (2017). Phytochemical, ethnomedicinal uses and pharmacological profile of genus *Pistacia*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 86, 393–404. [CrossRef]
5. Mahjoub, F., Akhavan Rezayat, K., Yousefi, M., Mohebbi, M., Salari, R. (2018). *Pistacia atlantica* Desf. A review of its traditional uses, phytochemicals and pharmacology. *Journal of Medicine and Life*, 11(3), 180–186. [CrossRef]
6. TÜBİVES. Türkiye Bitkileri Veri Servisi. Web Sitesi. From http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php?sayfa=hizli_ara. Erişim Tarihi: 27.02.2022.
7. Ahmed, Z.B., Yousfi, M., Viaene, J., Dejaegher, B., Demeyer, K., Vander Heyden, Y. (2021). Four *Pistacia atlantica* subspecies (*atlantica*, *cabulica*, *kurdica* and *mutica*): A review of their botany, ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 265, 113329. [CrossRef]
8. Milia, E., Bullitta, S.M., Mastandrea, G., Szotáková, B., Schoubben, A., Langhansová, L., Quartu, M., Bortone, A., Eick, S. (2021). Leaves and Fruits Preparations of *Pistacia lentiscus* L.: A Review on the Ethnopharmacological Uses and Implications in Inflammation and Infection. *Antibiotics (Basel)*, 10(4), 425. [CrossRef]
9. Tanker, N., Koyuncu, M., Coşkun, M. (2007). *Farmasötik Botanik*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 265-266.
10. Pachi, V.K., Mikropoulou, E.V., Gkiouvetidis, P., Siafakas, K., Argyropoulou, A., Angelis, A., Mitakou, S., Halabalaki, M. (2020). Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Chios mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. *chia*, Anacardiaceae): A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 254, 112485. [CrossRef]
11. Fernandez, A., Camacho, A., Fernandez, C., Altarejos, J., Pérez, P. (2000). Composition of the essential oils from galls and aerial parts of *Pistacia lentiscus* L. *Journal of Essential Oil Research*, 12(1), 19-23. [CrossRef]
12. Congiu, R., Falconieri, D., Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S. (2002). Extraction and isolation of *Pistacia lentiscus* L. essential oil by supercritical CO₂. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(4), 239-244. [CrossRef]

13. Duru, M.E., Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Harmandar, M., Izumi, S., Hirata, T. (2003). Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia*, 74(1-2), 170–176. [\[CrossRef\]](#)
14. Zrira, S., Elamrani, A., Benjilali, B. (2003). Chemical composition of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Morocco-a seasonal variation. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(6), 475-480. [\[CrossRef\]](#)
15. Assimopoulou, A.N., Papageorgiou, V.P. (2005). GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. *chia*. *Biomedical Chromatography*, 19(4), 285–311. [\[CrossRef\]](#)
16. Benyoussef, E. H., Charchari, S., Nacer-Bey, N., Yahiaoui, N., Chakou, A., Bellatreche, M. (2005). The essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 17(6), 642-644. [\[CrossRef\]](#)
17. Koutsoudaki, C., Krsek, M., Rodger, A. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* var. *chia*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7681–7685. [\[CrossRef\]](#)
18. Dob, T., Dahmane, D., Chelghoum, C. (2006). Chemical composition of the essential oils of *Pistacia lentiscus* L. from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 18(3), 335-338. [\[CrossRef\]](#)
19. Chryssavgi, G., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T., Michael, K. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*, 107(3), 1120-1130. [\[CrossRef\]](#)
20. Mecherara-Idjeri, S., Hassani, A., Castola, V., Casanova, J. (2008). Composition and chemical variability of the essential oil from *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Algeria part I: leaf oil. *Journal of Essential Oil Research*, 20(1), 32-38. [\[CrossRef\]](#)
21. Paraschos, S., Magiatis, P., Gousia, P., Economou, V., Sakkas, H., Papadopoulou, C., Skaltsounis, A.L. (2011). Chemical investigation and antimicrobial properties of mastic water and its major constituents. *Food Chemistry*, 129(3), 907-911. [\[CrossRef\]](#)
22. Roitman, J. N., Merrill, G. B., Beck, J. J. (2011). Survey of ex situ fruit and leaf volatiles from several *Pistacia* cultivars grown in California. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 91(5), 934–942. [\[CrossRef\]](#)
23. Kawashty, S. A., Mosharrafa, S. A., El-Gibali, M., Saleh, N. A. (2000). The flavonoids of four *Pistacia* species in Egypt. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(9), 915–917. [\[CrossRef\]](#)
24. Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N., Tattini, M. (2002). Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochemical Analysis*, 13(2), 79–86. [\[CrossRef\]](#)
25. Abdelwahed, A., Bouhlel, I., Skandrani, I., Valenti, K., Kadri, M., Guiraud, P., Steiman, R., Mariotte, A.M., Ghedira, K., Laporte, F., Dijoux-Franca, M.G., Chekir-Ghedira, L. (2007). Study of antimutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*. Confirmation by microarray expression profiling. *Chemico-Biological Interactions*, 165(1), 1–13. [\[CrossRef\]](#)

26. Longo, L., Scardino, A., Vasapollo, G. (2007). Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(3), 360-364. [\[CrossRef\]](#)
27. Bhouri, W., Derbel, S., Skandrani, I., Boubaker, J., Bouhlel, I., Sghaier, M.B., Kilani, S., Mariotte, A.M., Dijoux-Franca, M.G., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L. (2010). Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia lentiscus* fruits. *Toxicology In Vitro*, 24(2), 509–515. [\[CrossRef\]](#)
28. Benhammou, N., Bekkara, F. A., Panovska, T. K. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(2), 022-028.
29. Sakagami, H., Kishino, K., Kobayashi, M., Hashimoto, K., Iida, S., Shimetani, A., Nakamura, Y., Takahashi, K., Ikarashi, T., Fukamachi, H., Satoh, K., Nakashima, H., Shimizu, T., Takeda, K., Watanabe, S., Nakamura, W. (2009). Selective antibacterial and apoptosis-modulating activities of mastic. *In vivo*, 23(2), 215–223.
30. Remila, S., Atmani-Kilani, D., Delemasure, S., Connat, J. L., Azib, L., Richard, T., Atmani, D. (2015). Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. *European Journal of Integrative Medicine*, 7(3), 274-286. [\[CrossRef\]](#)
31. Bouyahya, A., Assemian, I. C. C., Mouzount, H., Bourais, I., Et-Touys, A., Fellah, H., Bakri, Y. (2019). Could volatile compounds from leaves and fruits of *Pistacia lentiscus* constitute a novel source of anticancer, antioxidant, antiparasitic and antibacterial drugs? *Industrial Crops and Products*, 128, 62-69. [\[CrossRef\]](#)
32. Boucheffa, S., Sobhi, W., Attoui, A., Selli, S., Kelebek, H., Semmeq, A., Benguerba, Y. (2021). Effect of the main constituents of *Pistacia lentiscus* leaves against the DPPH radical and xanthine oxidase: experimental and theoretical study. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 1–15. Advance online publication. [\[CrossRef\]](#)
33. Barbouchi, M., Elamrani, K., El Idrissi, M., Choukrad, M. (2021). Lentisk (*Pistacia lentiscus* L.) a Renewable Source of Pure Shikimic Acid and its Antioxidant Activity. *Current Bioactive Compounds*, 16(2), 145-150. [\[CrossRef\]](#)
34. Douissa, F.B., Hayder, N., Chekir-Ghedira, L., Hammami, M., Ghedira, K., Mariotte, A.M., Dijoux-Franca, M.G. (2005). New study of the essential oil from leaves of *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) from Tunisia. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(4), 410-414. [\[CrossRef\]](#)
35. Hayder, N., Ben Ammar, R., Abdelwahed, A., Kilani, S., Mahmoud, A., Ben Chibani, J., Mariotte, A-M., Ghedira, K., Dijoux-Franca, M-G., Chekir-Ghedira, L. (2005). Antibacterial and antimutagenic activity of extracts and essential oil from (Tunisian) *Pistacia lentiscus*. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 87(4), 567-573. [\[CrossRef\]](#)
36. Marone, P., Bono, L., Leone, E., Bona, S., Carretto, E., Perversi, L. (2001). Bactericidal activity of *Pistacia lentiscus* mastic gum against *Helicobacter pylori*. *Journal of Chemotherapy*, 13(6), 611–614. [\[CrossRef\]](#)
37. Dabos, K.J., Sfika, E., Vlatta, L.J., Giannikopoulos, G. (2010). The effect of mastic gum on *Helicobacter pylori*: a randomized pilot study. *Phytomedicine*, 17(3-4), 296–299. [\[CrossRef\]](#)

38. Mharti, F.Z., Lyoussi, B., Abdellaoui, A. (2011). Antibacterial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* used in Moroccan folkloric medicine. *Natural Product Communications*, 6(10), 1505–1506.
39. Bouslama, L., Benzekri, R., Nsaibia, S., Papetti, A., Limam, F. (2020). Identification of an antiviral compound isolated from *Pistacia lentiscus*. *Archives of Microbiology*, 202(9), 2569–2578. [\[CrossRef\]](#)
40. Milia, E., Usai, M., Szotáková, B., Elstnerová, M., Králová, V., D'hallewin, G., Spissu, Y., Barberis, A., Marchetti, M., Bortone, A., Campanella, V., Mastandrea, G., Langhansová, L., Eick, S. (2020). The Pharmaceutical Ability of *Pistacia lentiscus* L. Leaves Essential Oil Against Periodontal Bacteria and *Candida* sp. and Its Anti-Inflammatory Potential. *Antibiotics (Basel)*, 9(6), 281. [\[CrossRef\]](#)
41. Dhieb, C., Trabelsi, H., Boukhchina, S., Sadfi-Zouaoui, N. (2021). Evaluation of Antifungal and Antibacterial Activities of Tunisian Lentisc (*Pistacia lentiscus* L.) Fruit Oil. *Journal of Food and Nutrition Research*, 9(4), 177-181. [\[CrossRef\]](#)
42. Alhadad, A. O., Elmhdwi, M. F., Salem, G. S., Elshareef, S. M. (2021). Evaluation the in vitro antibacterial activity of acetone leaf extracts from *Pistacia lentiscus* against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Plants*, 9(4), 100-105.
43. Kaliora, A.C., Stathopoulou, M.G., Triantafyllidis, J.K., Dedoussis, G.V., Andrikopoulos, N.K. (2007). Chios mastic treatment of patients with active Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology*, 13(5), 748–753.
44. Loizou, S., Paraschos, S., Mitakou, S., Chrousos, G.P., Lekakis, I., Moutsatsou, P. (2009). Chios mastic gum extract and isolated phytosterol tirucallol exhibit anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Experimental Biology and Medicine*, 234(5), 553–561.
45. Triantafyllou, A., Bikineyeva, A., Dikalova, A., Nazarewicz, R., Lerakis, S., Dikalov, S. (2011). Anti-inflammatory activity of Chios mastic gum is associated with inhibition of TNF-alpha induced oxidative stress. *Nutrition Journal*, 10, 64. [\[CrossRef\]](#)
46. Maxia, A., Sanna, C., Frau, M.A., Piras, A., Karchuli, M.S., Kasture, V. (2011). Anti-inflammatory activity of *Pistacia lentiscus* essential oil: involvement of IL-6 and TNF-alpha. *Natural Product Communications*, 6(10), 1543–1544.
47. Gioxari, A., Kaliora, A.C., Papalois, A., Agrogiannis, G., Triantafyllidis, J.K., Andrikopoulos, N.K. (2011). *Pistacia lentiscus* resin regulates intestinal damage and inflammation in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Journal of Medicinal Food*, 14(11), 1403–1411. [\[CrossRef\]](#)
48. Santarsiero, A., Onzo, A., Pascale, R., Acquavia, M.A., Coviello, M., Convertini, P., Todisco, S., Marsico, M., Pifano, C., Iannece, P., Gaeta, C., D'Angelo, S., Padula, M.C., Bianco, G., Infantino, V., Martelli, G. (2020). *Pistacia lentiscus* Hydrosol: Untargeted Metabolomic Analysis and Anti-Inflammatory Activity Mediated by NF- κ B and the Citrate Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 4264815. [\[CrossRef\]](#)

49. Boutemine, I.M., Amri, M., Dorgham, K., Amir, Z.C., Benazzouz, S., Ameer, F., Layaida, K., Yssel, H., Touil-Boukoffa, C. (2021). Beneficial role of *Pistacia lentiscus* aqueous extract in experimental colitis: anti-inflammatory and potential therapeutic effects. *Inflammopharmacology*, 29(4), 1225–1239. [\[CrossRef\]](#)
50. Liu, W., Gao, J., Li, M., Aisa, H.A., Yuan, T. (2021). Tirucallane triterpenoids from the mastic (*Pistacia lentiscus*) and their anti-inflammatory and cytotoxic activities. *Phytochemistry*, 182, 112596. [\[CrossRef\]](#)
51. Dabos, K.J., Sfika, E., Vlatta, L.J., Frantzi, D., Amygdalos, G.I., Giannikopoulos, G. (2010). Is Chios mastic gum effective in the treatment of functional dyspepsia? A prospective randomised double-blind placebo controlled trial. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(2), 205–209. [\[CrossRef\]](#)
52. Rahimi, R., Baghaei, A., Baeri, M., Amin, G., Shams-Ardekani, M.R., Khanavi, M., Abdollahi, M. (2013). Promising effect of Magliasa, a traditional Iranian formula, on experimental colitis on the basis of biochemical and cellular findings. *World Journal of Gastroenterology*, 19(12), 1901–1911. [\[CrossRef\]](#)
53. Naouar, M.S., Mekki, L.Z., Charfi, L., Boubaker, J., Filali, A. (2016). Preventive and curative effect of *Pistacia lentiscus* oil in experimental colitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, 577–583. [\[CrossRef\]](#)
54. Rostamani, H.R., Semnani, S., Yousefi, M. (2021). Persian traditional medicine in treatment of ulcerative colitis: A case report. *Research Journal of Pharmacognosy*, 8(1), 1-6. [\[CrossRef\]](#)
55. Barimani, S., Nimrouzi, M., Ebrahimi Daryani, N., Karimi, M., Heydari, S.T., Ebadiani, M., Hatami, K., Fallahzadeh, E. (2021). The Efficacy of a Persian Medicine Formulation on Adult Functional Constipation: A Double-Blinded Clinical Trial. *Shiraz E-Medical Journal*, 22(4). [\[CrossRef\]](#)
56. Kakagia, D., Papalois, A., Lambropoulou, M., Papachristou, F., Trypsiannis, G., Anagnostopoulos, C., Pitiakoudis, M., Tsaroucha, A. (2020). The Use of *Pistacia lentiscus chia* Resin Versus Omeprazole in Protecting Male Rats Peptic Mucosa Against Cold Restraint Stress. *Journal of Critical Care Medicine (Universitatea de Medicina si Farmacie din Targu-Mures)*, 6(2), 100–110. [\[CrossRef\]](#)
57. Janakat, S., Al-Merie, H. (2002). Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*. *Journal of Ethnopharmacology*, 83(1-2), 135–138. [\[CrossRef\]](#)
58. Maameri, Z., Djerrou, Z., Halmi, S., Djaalab, H., Riachi, F., Hamdipacha, Y. (2015). Evaluation of Hepatoprotective Effect of *Pistacia lentiscus* L. Fatty Oil in Rats Intoxicated by Carbon Tetrachloride. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7(2), 251-254.
59. Ljubuncic, P., Song, H., Cogan, U., Azaizeh, H., Bomzon, A. (2005). The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 198–204. [\[CrossRef\]](#)
60. Mehenni, C., Atmani-Kilani, D., Dumarçay, S., Perrin, D., Gérardin, P., Atmani, D. (2016). Hepatoprotective and antidiabetic effects of *Pistacia lentiscus* leaf and fruit extracts. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(3), 653-669. [\[CrossRef\]](#)

61. Rehman, M.S.U., Kamran, S.H., Ahmad, M., Akhtar, U. (2015). Anti-diabetic activity of crude *Pistacia lentiscus* in alloxan-induced diabetes in rats. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 10(3), 543-547. [\[CrossRef\]](#)
62. Vuorinen, A., Seibert, J., Papageorgiou, V.P., Rollinger, J.M., Odermatt, A., Schuster, D., Assimopoulou, A.N. (2015). *Pistacia lentiscus* Oleoresin: Virtual Screening and Identification of Masticadienonic and Isomasticadienonic Acids as Inhibitors of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1. *Planta Medica*, 81(6), 525–532. [\[CrossRef\]](#)
63. Ammari, M., Othman, H., Hajri, A., Sakly, M., Abdelmelek, H. (2018). *Pistacia lentiscus* oil attenuates memory dysfunction and decreases levels of biomarkers of oxidative stress induced by lipopolysaccharide in rats. *Brain Research Bulletin*, 140, 140–147. [\[CrossRef\]](#)
64. Dedoussis, G.V., Kaliora, A.C., Psarras, S., Chiou, A., Mylona, A., Papadopoulos, N.G., Andrikopoulos, N. K. (2004). Antiatherogenic effect of *Pistacia lentiscus* via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression. *Atherosclerosis*, 174(2), 293-303. [\[CrossRef\]](#)
65. Djerrou Z. (2014). Anti-hypercholesterolemic effect of *Pistacia lentiscus* fatty oil in egg yolk-fed rabbits: a comparative study with simvastatin. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(8), 561–566. [\[CrossRef\]](#)
66. Triantafyllou, A., Chaviaras, N., Sergeantanis, T.N., Protopapa, E., Tsaknis, J. (2007). Chios mastic gum modulates serum biochemical parameters in a human population. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 43–49. [\[CrossRef\]](#)
67. Azaizeh, H., Halahleh, F., Abbas, N., Markovics, A., Muklada, H., Ungar, E.D., Landau, S.Y. (2013). Polyphenols from *Pistacia lentiscus* and *Phillyrea latifolia* impair the exsheathment of gastro-intestinal nematode larvae. *Veterinary Parasitology*, 191(1-2), 44–50. [\[CrossRef\]](#)
68. Ezz Eldin, H.M., Badawy, A.F. (2015). *In vitro* anti-*Trichomonas vaginalis* activity of *Pistacia lentiscus* mastic and *Ocimum basilicum* essential oil. *Journal of Parasitic Diseases*, 39(3), 465–473. [\[CrossRef\]](#)
69. Saric, T., Rogosic, J., Zupan, I., Beck, R., Bosnic, S., Sikic, Z., Skobic, D., Tkalcic, S. (2015). Anthelmintic effect of three tannin-rich Mediterranean shrubs in naturally infected sheep. *Small Ruminant Research*, 123(1), 179-182. [\[CrossRef\]](#)
70. Maaroufi, Z., Cojean, S., Loiseau, P.M., Yahyaoui, M., Agnely, F., Abderraba, M., Mekhloufi, G. (2021). *In vitro* antileishmanial potentialities of essential oils from *Citrus limon* and *Pistacia lentiscus* harvested in Tunisia. *Parasitology Research*, 120(4), 1455–1469. [\[CrossRef\]](#)
71. Oliveira, M., Lima, C.S., Ketavong, S., Llorent-Martínez, E.J., Hoste, H., Custódio, L. (2021). Disclosing the bioactive metabolites involved in the *in vitro* anthelmintic effects of salt-tolerant plants through a combined approach using PVPP and HPLC-ESI-MSn. *Scientific Reports*, 11(1), 1-17. [\[CrossRef\]](#)
72. Kaliora, A.C., Stathopoulou, M.G., Triantafyllidis, J.K., Dedoussis, G.V., Andrikopoulos, N.K. (2007). Alterations in the function of circulating mononuclear cells derived from patients with Crohn's disease treated with mastic. *World Journal of Gastroenterology*, 13(45), 6031–6036.
73. He, M.L., Chen, W.W., Zhang, P.J., Jiang, A.L., Fan, W., Yuan, H.Q., Liu, W.W., Zhang, J.Y. (2007). Gum mastic increases maspin expression in prostate cancer cells. *Acta pharmacologica Sinica*, 28(4), 567–572. [\[CrossRef\]](#)

74. He, M.L., Li, A., Xu, C.S., Wang, S.L., Zhang, M.J., Gu, H., Yang, Y.Q., Tao, H.H. (2007). Mechanisms of antiprostata cancer by gum mastic: NF-kappaB signal as target. *Acta Pharmacologica Sinica*, 28(3), 446–452. [\[CrossRef\]](#)
75. Dimas, K., Hatziantoniou, S., Wyche, J. H., Pantazis, P. (2009). A mastic gum extract induces suppression of growth of human colorectal tumor xenografts in immunodeficient mice. *In vivo*, 23(1), 63–68.
76. Magkouta, S., Stathopoulos, G.T., Psallidas, I., Papapetropoulos, A., Kolisis, F.N., Roussos, C., Loutrari, H. (2009). Protective effects of mastic oil from *Pistacia lentiscus* variation *chia* against experimental growth of lewis lung carcinoma. *Nutrition and Cancer*, 61(5), 640–648. [\[CrossRef\]](#)
77. Doi, K., Wei, M., Kitano, M., Uematsu, N., Inoue, M., Wanibuchi, H. (2009). Enhancement of preneoplastic lesion yield by Chios Mastic Gum in a rat liver medium-term carcinogenesis bioassay. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 234(1), 135–142. [\[CrossRef\]](#)
78. Abidi, A., Aissani, N., Sebai, H., Serairi, R., Kourda, N., Ben Khamsa, S. (2017). Protective Effect of *Pistacia lentiscus* Oil Against Bleomycin-Induced Lung Fibrosis and Oxidative Stress in Rat. *Nutrition and Cancer*, 69(3), 490–497. [\[CrossRef\]](#)
79. Xanthis, V., Fitsiou, E., Voulgaridou, G.P., Bogadakis, A., Chlichlia, K., Galanis, A., Pappa, A. (2021). Antioxidant and Cytoprotective Potential of the Essential Oil *Pistacia lentiscus* var. *chia* and Its Major Components Myrcene and α -Pinene. *Antioxidants (Basel)*, 10(1), 127. [\[CrossRef\]](#)
80. Benamar, H., Rached, W., Derdour, A., Marouf, A. (2010). Screening of Algerian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Biological Sciences*, 10(1), 1-9. [\[CrossRef\]](#)
81. Djerrou, Z., Maameri, Z., Hamdi-Pacha, Y., Serakta, M., Riachi, F., Djaalab, H., Boukeloua, A. (2010). Effect of virgin fatty oil of *Pistacia lentiscus* on experimental burn wound's healing in rabbits. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines: AJTCAM*, 7(3), 258–263. [\[CrossRef\]](#)
82. Khedir, S.B., Bardaa, S., Chabchoub, N., Moalla, D., Sahnoun, Z., Rebai, T. (2017). The healing effect of *Pistacia lentiscus* fruit oil on laser burn. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1407–1414. [\[CrossRef\]](#)
83. Mezni, F., Miled, K., Khaldi, A., Larbi Khouja, M., Boubaker, S., Maaroufi, A. (2020). Wound healing effect of *Pistacia lentiscus* L. seed oil: confirmation of its uses in Mediterranean traditional medicine. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 19(3), 314-320.
84. Hemida, H., Doukani, K., Zitouni, A., Miloud, B., Beggar, H., Bouhenni, H. (2021). Assessment of wound healing activity of ethanolic extracts of *Pistacia lentiscus* L. leaves and *Quercus ilex* L. bark in full thickness skin excision in rats. *Advances in Traditional Medicine*, 1-9. [\[CrossRef\]](#)
85. Kishimoto, R., Kato, N., Koike, M., Iwashita, N., Takagi, Y., Fukuyama, T. (2021). Topical treatment with mastic (resin from *Pistacia lentiscus*) elicits anti-inflammatory and anti-pruritic responses by modulating keratinocyte activation in a mouse model of allergic dermatitis. *Phytomedicine*, 91, 153679. [\[CrossRef\]](#)

86. Elloumi, W., Mahmoudi, A., Ortiz, S., Boutefnouchet, S., Chamkha, M., Sayadi, S. (2022). Wound healing potential of quercetin-3-*O*-rhamnoside and myricetin-3-*O*-rhamnoside isolated from *Pistacia lentiscus* distilled leaves in rats model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 146, 112574. [\[CrossRef\]](#)
87. Pepe, A.E., Lelovas, P., Pachi, V.K., Halabalaki, M., Galanos, A., Mikou, P., Poutos, D.P., Papadomichelakis, G., Kourkoulis, S., Pasiou, E., Mitakou, S., Karatzas, T., Triantafyllou, A., Dontas, I.A. (2021). Chios Mastic Gum Consumption Has a Protective Effect on Ovariectomy-Induced Bone Loss in Rats. *Preventive Nutrition and Food Science*, 26(2), 166–176. [\[CrossRef\]](#)
88. Djerrou, Z., Djaalab, H., Riachi, F., Serakta, M., Chettoum, A., Maameri, Z., Boutobza, B., Hamdi-Pacha, Y. (2013). Irritancy potential and sub acute dermal toxicity study of *Pistacia lentiscus* fatty oil as a topical traditional remedy. *African journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 10(3), 480–489. [\[CrossRef\]](#)
89. Benalia, N., Boumechhour, A., Ortiz, S., Echague, C. A., Rose, T., Fiebich, B. L., Chemat, S., Michel, S., Deguin, B., Dahamna, S., Boutefnouchet, S. (2021). Identification of alkylsalicylic acids in Lentisk oil (*Pistacia lentiscus* L.) and viability assay on Human Normal Dermal Fibroblasts. *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 28, 22. [\[CrossRef\]](#)



UYUZ HASTALIĞI (SKABIYES), TEDAVİSİ VE UYUZ HASTALIĞI TEDAVİSİNDE KULLANILAN BİTKİLER

SCABIES, SCABIES TREATMENT AND PLANTS USED IN THE TREATMENT OF SCABIES

Jale AKGÖL^{1*} , Ayşegül KÖROĞLU² 

¹ Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, 03200,
Afyonkarahisar

² Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, 06100 Tandoğan,
Ankara

ÖZ

Amaç: Uyuz hastalığı (Skabiyes) dünyada yaygın olarak görülen kaşıntılı, döküntülü ve bulaşıcı ektoparaziter bir hastalıktır. Etken *Sarcoptes scabiei* var. *hominis* adı verilen mikroskobik bir eklem bacaklıdır. Her yaş, cinsiyet, coğrafya ve kültürden insanı etkileyebilir. Gelişmekte olan ülkeler, tropikal ve subtropikal ülkelerde endemik olan parazit nedeni bu hastalık, büyük kalabalıklar ve hijyenin korunamadığı ortamlarda salgınlar yapabilir. Tedavide topikal ve oral olarak kullanılan seçenekler kısıtlı sayıdadır. Permetrin, Benzil Benzoat, Kükürtlü merhemler, Lindan, İvermektin gibi ilaçların birçoğu toksik etkilerinden dolayı bebek, çocuk, gebe ve laktasyon ile ilgili kısıtlılıklar nedeniyle risk altındaki tüm popülasyonlara uygulanamamaktadır. Scabiyes tedavi edilmediğinde, özellikle pediatrik yaş grubunda görülen piyoderma, impetigo gibi sekonder enfeksiyonların da tabloya eklenmesi, hastalığın yükünü artırmaktadır. Bu nedenle daha az toksik etkileri olan ilaç arayışları halihazırda kullanılan bitkilere olan ilgiyi de canlı tutmaktadır.

Sonuç ve Tartışma: Sporadik ya da epidemik tüm vakalarda, yayılımı önlemek için skabiyesin etkin tedavisi şarttır. Başarılı bir tedavi, ilaç uygulamasının doğru yapılmasına, tedavinin komplikasyonlar ve semptomları kontrol etmeye yönelik ek yaklaşımları içermesine ve beraberinde koruyucu önlemlerin alınmasına bağlıdır. Bu derlemede skabiyes, tedavisi, kullanılan ilaçlar, kullanılma potansiyeli olan yeni ilaçlar ve geleneksel olarak kullanılan bitkiler incelenmiştir. Ülkemizde yetişen, tanınan ve yetiştirme potansiyeli olan 49 taksonun uyuz hastalığı tedavisinde kullanıldığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Skabiyes, skabiyes tedavisi, tıbbi bitkiler, uyuz hastalığı

ABSTRACT

Objective: Scabies are an itch and contagious ectoparasite that is common around the World. There is the causative *Sarcoptes scabiei* var. *hominis*. It can affect people of all ages, sexes, geographies and cultures. It is endemic in developing countries, tropical and subtropical countries. It can cause epidemics in large crowds

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Jale Akgöl
e-posta / e-mail: jale.akgol@afsu.edu.tr, Tel. / Phone: +902722463304

and environments where hygiene cannot be maintained. Topical and oral options for treatment are limited. Drugs such as Permethrin, Benzyl Benzoate, Sulfur Ointments, Lindan, Ivermectin cannot be applied to all populations at risk due to their toxic effects, infants, children, pregnant women, and lactation-related restrictions. When scabies are not treated, the addition of secondary infections such as pyoderma and impetigo, which are seen especially in the pediatric age group, increases the burden of the disease. For that reason, the search for drugs with less toxic effects keeps the interest in plants still alive.

Result and Discussion: In all cases of sporadic or epidemic, effective treatment of scabies is essential to prevent to spread. Successful treatment depends on the correct administration of the medication, the inclusion of additional approaches to control complications and symptoms and the taking of preventive measures. In this review, scabies, their treatment, drugs used, new drugs with the potential to be used and traditionally used plants were examined. It has been determined that 49 taxa that are grown, known and have the potential to grow in our country are used in the treatment of scabies.

Keywords: Human scabies, medicinal plant, scabies, scabies treatment

GİRİŞ

Uyuz hastalığı (Skabiyes), 1687'de İtalyan hekim Giovan Cosimo Bonomo ile eczacı Diacinto Cestoni'nin akar ısırıkları ile cilt lezyonları arasındaki bağı ilişkilendirmesiyle birlikte, hastalık nedeni olarak bir mikroorganizmanın tanımlandığı tıp tarihindeki ilk hastalıktır [1]. Skabiyes etkeni, *Sarcoptes scabiei* var. *hominis*, artropod sınıfından mikroskopik bir akar olup, her yaş, cinsiyet, coğrafya ve kültürden insanı etkileyebilen ve insandan insana deri-deri veya giysi, çarşaf gibi eşyalarla temas yoluyla bulaşan bir ektoparazittir [2].

Dünya üzerinde görülme prevalansı, literatürlere göre %0,2-71 aralığında değişmektedir. Sosyoekonomik düzeyi düşük olan ülkelerde daha çok görülmekle birlikte, bu oranlar arası farklılıkları belirleyen diğer parametreler, bulaşma zemin oluşturan koşullardır. Savaş, göç gibi karışıklıkların olduğu büyük kalabalıklar, hapishaneler, çocuk-yaşlı bakım evleri, kışla ve okul gibi kurumsal ortamlar, malnütrisyon ve zayıf hijyen ile birleştiğinde enfestasyon riskini artırmaktadır. İkinci dünya savaşında sadece Büyük Britanya'da 2 milyondan fazla skabiyesli hasta görüldüğü tahmin edilmektedir [3, 4]. Gelişmiş ülkelerde vakalar sıklıkla sporadiktir, ancak skabiyesin hastane kaynaklı salgınları da literatürde mevcuttur [5]. Ülkemizde de dönem dönem bölgesel salgınların olduğu bilinmektedir [6, 7]

Uyuz hastalığı (Skabiyes), günümüzde gelişmekte olan üçüncü dünya ülkeleri, tropikal ve subtropikal ülkelerde endemiktir ve vakaların %5-10'unu çocuklar oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü skabiyesi, farkındalığını ve alınacak önlemleri arttırmak üzere "İhmal Edilen Tropikal Hastalıklar ve Diğer İhmal Edilen Resmi Hastalıklar" listesine 2013 yılında eklemiştir [8]. Geç tanı, etkin olmayan yetersiz tedaviler ve enfestasyona sekonder gelişen A grubu beta hemolitik streptokoklar ve stafilocoklar ile ilişkili piyoderma, impetigo, glomerulonefrit, romatizmal ateş ve sepsis gibi komplikasyonlar, hastalığın yükünü arttırmaktadır. Yakın zamanda yapılan Küresel Hastalık Yüku Araştırmasında (Global Burden of Disease 2015 Study) skabiyes, 246 hastalık arasından akut lenfoid lösemi ve atriyal fibrilasyonun önüne geçerek 101. sırayı almıştır. Bu anlamda küresel bir sağlık sorunu olan skabiyesin, tanı ve tedavisinin doğru yapılması çok önemlidir [9].

Akarın 0,3-0,5 mm boyu nedeniyle, çıplak gözle görülmesi pek mümkün değildir. Sarkoptlar enfekte bireyle uzun temas (en az 10 dakika), kondomlu ya da kondomsuz cinsel ilişki ve risk az da olsa kontamine nesnelere aracılığıyla bulaşır. Kişi semptom göstermeye başlamamış olsa bile bulaş mümkündür. Alkol bazlı ürünlerin kullanımı, eldeki akarların ölümü için yeterli değildir, bulaşı önlemez [10]. İnsan vücudu dışında sarkoptlar oda sıcaklığında 24-36 saat içinde ölürlür. Hayvanlar, insan skabiyesini yaymazlar [11].

Bulaş sonrası dişi sarkoptların stratum corneum tabakasında açtıkları tünellere bıraktıkları yumurta ve feçes gibi proteinlere karşı gelişen kişisel immün yanıt, hem hızlı yanıtta sorumlu antikor aracılı hem de hücresel tipte gecikmiş tip bağışık yanıt sonucudur. Skabiyesde görülen ekskoriye papüller ve nodüller, hücresel tipte gecikmiş tip reaksiyon sonucu gelişir. Alerjik ürtiker plaklar, antikor yanıtına sekonder oluşumlardır. Bu plaklar altında kalan tünel ve veziküller nedeniyle tanı atlanabilir [12]. Semptomlar ilk bulaştan 3-6 hafta sonra ortaya çıkar. Hastalığın klasik, nodüler krutlu skabiyes gibi bilinen klinik örnekleri dışında atipik formları da mevcuttur. Bu farklı klinik formlar aşağıda açıklanmıştır.

Klasik Skabiyes

İmmün sistemi sağlıklı olan bireylerde görülür. Enfestasyon 5-10 akarla başlar. Özellikle geceleri artan şiddetli kaşıntı şikâyeti, parmak araları, el bileği, koltukaltı, kasık, göbek çevresi, meme areolası, genital alan gibi tipik yerleşim bölgelerinde dağılım gösteren, yaygın eritamatoz papüler lezyonlar, inflamatuvar nodüller, patognomik lezyonların (sillion-vezikül perle) varlığı ve yakın çevrede benzer öykü ile şüphe edilir. Steroid ya da immünsüpresif tedavi almak semptomları baskılayabilir. Çocuklarda inflamasyon yetişkinlere göre daha şiddetli olur ve yerleşim yerleri daha geniş bir dağılım gösterir [13].

Krutlu Skabiyes

Daha çok immün yetmezlikli kişilerde ya da klasik skabiyesin steroidle yanlış tedavisi sonrası görülen, gri-sarı renkli diffüz hiperkeratozun ve krutların tabloya hakim olduğu, daha geniş tutulum gösteren, daha az kaşıntılı ve çok daha bulaşıcı olan formudur. Enfestasyon sırasında binlerce akar tespit edilebilir. Tutulum yüz, ense, gövde, saçlı deride ve tırnaklar ile subungal alanda görülebilir [14].

Nodüler Skabiyes

Skabiyesin nadir görülen bir formudur. Özellikle peniste eritamatoz, sert ve kaşıntılı nodüler lezyonlarla karakterizedir. Skabiyeseye karşı gelişen aşırı duyarlılık reaksiyonu sonucu oluştuğu düşünülmektedir [15].

Skabiyes teşhisinde ayırıcı tanıda; atopik dermatit, dermatitis herpetiformis, seboreik dermatit, diğer parazit enfestasyonları, sifiliz (frengi), alerjik reaksiyonlar, fungal enfeksiyonlar, çeşitli ürtikerle ilişkili sendromlar ve eritema multiforme gibi hastalıklar akla gelmelidir. Kesin tanı, cilt kazıntısının

mikroskopik incelemesinde akar, yumurta veya feçes görülmesi ile konur. Sillion mürekkep testi, video dermatoskopi, akar proteinlerine spesifik IgE'lerin gösterilmesi, PCR veya Elisa gibi serolojik testler de diğer alternatif tanı yöntemleri arasında yer alır [16, 17].

Aristoteles'ten (MÖ 384-322) bu yana bilindiği düşünüldüğünde en az 2500 yıldır insanlarla bir arada olan ve dünyada yıllık 200-300 milyon vaka ile insanları enfekte etmeye devam eden *Sarcoptes scabiei* var. *hominisin* etkeni olduğu skabiyes, belirtildiği gibi sadece bir kaşıntı olarak değerlendirilmemelidir. Skabiyes etkili ve erken tedavi edilmezse iş performansında düşüş, uyku bozuklukları, psikososyal sorunlar ile yaşam kalitesini de etkiler ve bu alanlarda da tedavi gereksinimini tetikleyebilir [18, 19].

Sporadik ya da epidemik tüm vakalarda, yayılımı önlemek için skabiyesin etkin tedavisi şarttır. Tedavide topikal ve oral olarak kullanılan seçenekler kısıtlı sayıdadır. Daha az toksik etkileri olan ilaç arayışları, erişilebilir ve halihazırda kullanılan bitkisel ilaçlara olan ilgiyi canlı tutmaktadır [12]. Bu derlemede skabiyes, tedavisi, kullanılan ilaçlar, kullanılma potansiyeli olan yeni ilaçlar ve geleneksel olarak kullanılan bitkilerin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç çerçevesinde hastalık; klasik kitaplar, ülkemizde ve dünyada yapılmış etnobotanik çalışmalar, periyodik olarak yayınlanan basılı ve elektronik dergiler, Ankara Üniversitesi e-kütüphanesi, Google Books, Google Akademik, Science Direct, Scopus, Web of Science gibi büyük veri tabanları ile uluslararası indeksler (PubMed) aracılığıyla, 2000 yılından itibaren Türkçe ve İngilizce dillerde *Skabiyes*, *Skabiyes tedavisi*, *Tıbbi bitkiler*, *Uyuz hastalığı* anahtar kelimeleri seçilerek taranmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Skabiyes Tedavisi

Skabiyesde tedavi düzenlenirken hastanın kliniği, yaşı, immünitesi, üreme çağındaki kadınlarda hamilelik-laktasyon durumu, egzama varlığı ve genişliği, ilaçların potansiyel toksisitesi, maliyet-etkin tedavi, ilacın bulunabilirliği, müdahalenin sporadik mi salgın koşullarında mı yapılacağı ve daha önce yapılan tedaviye direnç öyküsü önemli parametrelerdir [18] [20]. En iyi planlamada dahi tedavide en önemli basamak, hastanın tedaviye uyumudur. İlacı yanlış kullanmak, eksik uygulama, hasta ile birlikte şikayetler olmasa bile aile fertlerinde de eş zamanlı tedaviye başlanmaması ve kontamine eşyaların doğru temizlenmemesi sebebiyle gelişen reinfestasyon, tedavi başarısızlığının nedenleri arasındadır. Skabiyesde tabloya sekonder enfeksiyonlar eklenmiş olabilir. Tedavide antiskabisidal ilaçlar yanında, semptom ve komplikasyonları önlemeye yönelik ilaçlara da gereksinim duyulabilir (Tablo 1). Tedavide topikal (Pertmetrin, Benzil benzoat, Malation, Sülfür, Lindan, Krotamiton) veya ağız yoluyla uygulanan (İvermektin) gibi ilaçlar kullanılmaktadır [21].

Tablo 1. Skabiyes tedavisinde semptomlar ve ilaçlar

Şiddetli Kaşıntı - Oral Antihistaminik (1-2 hafta)
Allerjik Kontakt Dermatit - İlaç kes -Topikal steroid ekle
Şiddetli cilt irritasyonu - Topikal steroid /Kısa süreli sistemik steroid
Nodüler Skabiyes - İntralezyoner steroid
Krutlu Skabiyes - Keratoz - Keratolitik ajanlar (%5-10 salisilik asit/vazelin)
Sekonder enfeksiyonlar - Gram pozitif etkili sistemik antibiyotik (7 gün)
Kuru egzamalı cilt - Nemlendiriciler

Skabiyes Tedavisinde Kullanılan Topikal ve Sistemik İlaçlar

Skabiyes Tedavisinde Kullanılan Topikal İlaçlar

Permetrin (%5)

Chrysanthemum chalingolicum Grubov (Sin.: *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Trevir.) Vis.; Compositae) bitkisinden elde edilen piretrum adlı bir insektisit bileşiğin sentetik türevidir. Krem ve losyon formları olan skabisidal ve ovisidal etkili, topikal olarak uygulanan ve 1980'lerden bu yana güvenle kullanılan bir ilaçtır. Piretroidlerin etki mekanizması, akarın santral sinir sistemi (SSS) hücrelerinde sodyum (Na⁺) iyon akışını bozarak, gecikmiş repolarizasyonla beraber paralizasyonu sonucunda ölümüne yol açmaktadır. Farmakokinetik açıdan ciltten sistemik emilimi çok azdır. İnaktif metabolitlerine çok hızlı metabolize olur ve 1 hafta içinde idrarla atılır. Uluslararası birçok kılavuzda, klasik nonkomplike skabiyesde ilk tercih edilecek ilaç olarak önerilmektedir. Avrupa Uyuz Hastalığı Kılavuzuna göre semptomatik kişiler için 7 gün arayla 2 kür, temaslara ise ilk tedaviyle eş zamanlı tek kür yeterlidir. Tek doz tedavi de küratiftir. Gebede ve laktasyonda güvenle kullanılabilir. 2 ay üzeri çocuklar için FDA onayı vardır [22, 23]. Karayip açıklarında 760 kişinin yaşadığı San Blas adası yerlilerinin skabiyes salgınında 18 yıl süreyle Lindan ve Crotamiton ürünleri ile sürdürülmeye çalışılan tedavi yerine, tek kür topikal Permetrin kullanımı ile %33 olan prevelansın % 1'e düştüğünün gösterildiği Lanset'te yayımlanan çalışma, ilacın etkin ve güvenilir olması yanında sekonder enfeksiyon görülme sıklığını da azalttığını vurgulayan çarpıcı bir örnektir [24, 25].

Skabiyes tedavisinde losyonun %5'lik formunun; 12 yaş ve üstü yetişkinler için 30 ml; 6-12 yaş için 15 mL; 5 yaş-1 yaş için 7,5 mL; 2ay-1 yaş için 3,75 mL kullanılması önerilmektedir.

Uygulama: İlaç; sıcak su ile banyo yaptıktan ortalama 1 saat sonra, vücut kuru ve serin iken, boyundan aşağı sadece semptomatik alan değil kıvrım yerleri, parmak araları, tırnak altı alan, genital bölgeleri de içerecek şekilde sürülerek uygulanır. Bebek ve çocuklarda uygulama, ağız ve göz korunacak şekilde yüz bölgesini de içermelidir. Uygulama sırasında el yıkanır, ilaç ele tekrar sürülmelidir. Vücut 8-12 saat sonra yıkanır. Önerilen tek doz tedavi 7 gün sonra tekrarlanabilir. İlaç-ilaç etkileşimi bildirilmemiştir. Tedavi sırasında mukozalar korunmalıdır. Yan etki olarak bir miktar kaşıntı, yanma,

kızarma, iğnelenme hissi bildirilmiştir, fakat bu belirtiler çoğu zaman infestasyonun semptomlarından ayrılamaz [26].

Dünya çapında zirai mücadelede de permetrin çok fazla kullanılmasına rağmen, toksisitesine dair literatürde az sayıda vaka mevcuttur. Çocuklarda zehirlenme ile ilgili yoğun bakım yatışını gerektiren çok az vakadan biri, küçük bir köpeği permetrin içeren bir şampuanla yıkadıktan sonra, 6 yaşlarında 3 kız çocuğunun bulantı, kusma gibi gastrointestinal şikâyetlerle başlayıp, bilinç kaybı ve status epileptikus gelişmesi ile yoğun bakımda takip edilmeleridir. Zehirlenmeye bağlı gelişen nöbetlerin, yüksek dozlu permetrinin GABA (Gama Amino Butirik asit) klor kapılarına olan etkisi sorumlu tutulmaktadır. Permetrin zehirlenmesinde uygulanan özel bir antidot yoktur. Kolinerjik bulgulardan dolayı uygulanan atropinden fayda göremeyen ve dirençli nöbetler için benzodiyazepin türevi ilaçlar kullanılan hastalar, destekleyici tedaviye yanıt vererek iyileşmişlerdir [27]. Taiwan’da permetrinin oral alan 48 vakada da gastrointestinal şikâyetler (%79), pulmoner fibrozis-ödem (%29) ve nörotoksikite (%33) bildirilmiştir [28]. Permetrine karşı *in vitro* rezistans bildirilse de *in vivo* rezistans sıklıkla tedavinin efektif yapılamamasıyla ilgili vakalarda olup, bildirilen olgular az sayıdadır [29, 30].

Benzil Benzoat (%10-25)

1930’lardan bu yana kullanılmaktadır. Benzil alkolün benzoik asit ile yaptığı esterdir. Orta ve Güney Amerika’da doğal olarak yetişen Afrika’da ise kültürü yapılan *Myroxylon balsamum* (L.) Harms var. *pereire* (Royle) Harms (Fabaceae)’ın gövde kabuklarına yapılan yaralardan akan balsamdır. Bu doğal ürün, Peru balsamı (Peru balsam, Peruvian balsam) olarak bilinir ve benzoik asit bu balsamın bileşiminde doğal olarak bulunur. Peru balsamı yağ kıvamında, renksiz, suda çözünmeyen bir sıvıdır. %10-25’lik emülsiyon (losyon) formları olan güçlü skabisidal etkili bir üründür. Alkali ortamda hidrolize uğrar, etkinliğini kaybeder. Kokusuzdur ve çamaşırları boyamaz [31]. Gebe-emziren ve 2 yaş altı çocuklarda kontrendikedir. Uygulamadan hemen sonra postskabetik egzamatöz reaksiyona sebep olarak cilt irritasyonu ve yanma şikayeti ile tabloyu kötüleştirir. Uyumla ilgili sorunlar yarattığı bildirilmiştir. Nörolojik komplikasyonlar özellikle yanlış kullanım ile ilişkili bulunmuştur [32].

Uygulama: Hasta 10 dakika bol sabunlu su ile yıkanır. Kurulandıktan sonra boyundan itibaren ilaç, tüm vücuda pamukla sürülerek uygulanır. Özellikle parmak araları, kadınlarda meme altı, koltuk altları ve derinin kıvrım yerleri fazla bastırılmadan ovulur. Benzil benzoat göz ve mukoz membranlar için irritan özelliğe sahiptir, bu nedenle vücudun bu kısımları ile temas ettirilmemelidir. İlacın uygulanmasından sonra, 5-10 dakika çamaşır giyilmeden beklenir ve daha sonra banyodan önce çıkarılan giysiler, yeniden bulaşmayı önlemek ve giysiler üzerindeki sarkoptların imhasını sağlamak amacıyla yeniden giyilir. Uygulamadan 24 saat sonra sıcak veya ılık su ile banyo yapılır. Banyo yapma olanağı bulunmadığı durumlarda ilaç, günde bir defa olmak ve ilk iki gün çamaşırlar da değiştirilmemek koşuluyla üç gün süreyle uygulanabilir [33].

Malation %0,5

Malation organofasfatlı bir insektisittir. 1970'lerden beri kullanılmaktadır. Avrupa Uyuz Hastalığı Kılavuzuna göre, İngiltere'de kullanımı yasaklanmıştır. Diğer ülkelerde de nadiren kullanılmaktadır.

Uygulama: 6 ayın üzerindeki çocuklarda ve yetişkinlerde malation %5'lik losyon veya sıvı formları tüm vücuda permetrin gibi sürülür. İlaç 24 saat sonra yıkanarak vücuttan uzaklaştırılır [34].

Kükürtlü merhemler

Napolyon Bonapart'ın, savaşta yardım ettiği bir askerden kaptığı skabiyes için kükürt tedavisi alıp almadığı Fransa tarihinde tartışılmakla birlikte, kükürt bileşiklerinin sadece imparatorlar değil yüzyıllardır farklı sınıftan birçok insan tarafından kullandığı da bir gerçektir [35]. Kötü kokuludur, giysileri boyar ve cilt için iritan olabilir. Düşük toksisitesi olması nedeniyle 2 ayın altındaki infantlar, küçük çocuklar ile gebelerde ve laktasyondaki kadınlarda tercih edilmektedir. Maliyet ön plana alındığında tercih edilen bir ilaçtır. Bugün için ilk seçenek kükürtlü merhemler olmasa da alternatif ilaçların olmadığı salgınlarda etkili oldukları gözlenmiştir. Avrupa Uyuz Hastalığı Kılavuzunda Permetrin, Benzil benzoat ve İvermektin ile tedavi edilemeyen olgularda önerilse de ülkemiz için permetrinin alternatifi olarak ilk tercihtir. Kükürt erişkinlerde, presipite kükürdün vazelin içindeki %10'luk ve çocuklarda %5'lik merhemi halinde uygulanır. Ardıç katranı (huile de cade, cade oil) ve kükürt içeren; Wilkinson pomadı formu da mevcuttur. Ardıç katranı, *Juniperus oxycedrus* L. (Cupressaceae)'un yaprak ve dallarının kuru kuruya distilasyonu ile elde edilen koyu kahve renkli, bal kıvamında, yarı akışkan özellikte bir maddedir [32].

Uygulama: Temiz vücuda 24 saatte bir kez, 2-3 gün süreyle sürme şeklindedir. Son uygulamadan 24 saat sonra vücut temizlenir [36].

Krotamiton %10 (Eurax, *n*-ethylo-crotonoluide)

Renksiz, kokusuz, suda çözünmeyen antipruritik etkili skabisiddir. 1970'lerden bu yana kullanılmaktadır. İnfantlarda, gebelik ve laktasyon dönemindeki kadınlarda kullanılabilir [37].

Uygulama: Temiz vücuda sürüldükten 24 saat sonra yıkanarak vücut temizlenir. Temiz vücuda aynı şekilde tekrar uygulanır. Bu işlem 3-5 kez tekrar edilir. İçerdiği yardımcı maddelere karşı kontakt dermatit gelişebilir. Özellikle çocuklarda sık kullanımdan kaçınılmalıdır [37].

Lindan (Gama-benzenhekzaklorür)

Organoklorlu pestisitlerdendir. %1'lik krem, losyon ve şampuan formları mevcuttur. Nöbet ve aplastik anemiye neden olan toksisitelerinden dolayı İngiltere, Avustralya gibi bazı ülkelerde kullanımı yasaktır. Türkiye'de de belirtilen nörotoksik etkilerden dolayı piyasadan kaldırılmıştır. Diğer tedavilerin

başarısız olduğu durumlarda alternatif bir tedavi olarak kullanılmaktadır. Banyodan hemen sonra uygulanmamalıdır. Gebe ve emziren kadınlar ile 10 yaşın altındaki çocuklarda kullanımından kaçınılmalıdır [38].

Uygulama: Tüm vücuda sürüldükten 8 saat sonra yıkanılarak uygulanır. Ekotoksiktir, kullanımı farmasötik su kontaminasyonunu azaltmak için bazı bölgelerde yasaklanmıştır [39].

Çay ağacı uçucu yağı (tea tree oil) 0.002-2%

Melaleuca alternifolia (Maiden & Betche) Cheel'nın (çay ağacı; Myrtaceae) yapraklarından ve genç dal uçlarından su distilasyonu ile elde edilen uçucu yağdır. Kabuklu skabiye ve standart tedavilere cevap vermeyen dirençli vakalarda adjuvan topikal ilaç olarak etkinliği gösterilmiştir [40, 41].

Skabiye Tedavisinde Kullanılan Sistemik İlaçlar

İvermektin

Tahıl mahsüllerini korumak amaçlı geliştirilmiş bir böcek ilacı olan İvermektin'in yarı sentetik analogudur. İlaç omurgasızların sinir kaslarının glutamerjik klor kanallarına bağlanarak paralizisine ve ölümüne yol açarak etki gösterir. Oral alımı sonrası 4-5 saatte kanda pik düzeyini yapar, plazma proteinlerine %93 oranında bağlanmaktadır. İvermektin'in yarı ömrü 14 saattir. İvermektin sitokrom p450 3A4 için bir substrattır. Metabolizmasında bu yolağı kullanan ilaç etkileşimleri açısından dikkatli olunmalıdır. İdrarda metabolitleri ölçülemez, yağ çözünürlüğü yüksek olsa da santral sinir sistemine geçmez. GABA reseptörleri üzerinde etkileri nedeniyle kan-beyin bariyeri bozuk kişilerde kontrendikedir ve SSS'ni deprese eden valproat, benzodiyazepin ve barbitüratlarla beraber dikkatli kullanılmalıdır. Ülkemizde insan kullanımı için bu amaçla hazırlanmış bir preparatı yoktur [42].

Uygulama: 200 µg/kg doz olarak kullanılır. Kür 7 gün sonra aynı dozla tekrarlanır. Tek doz permetrinle karşılaştırıldığı metaanaliz çalışmalarında aynı etkinliğe için 2 doz alımı önerilmektedir [43] (Tablo 2).

Tablo 2. Skabiye Tedavisi

Klasik Skabiye Tedavisi	1 hafta arayla 2 kür topikal %5 Permetrin uygulama
Krutlu Skabiye Tedavisi	1-2 hafta boyunca 2-3 günde 1 defa % 5 permetrin topikal tedavisine ek olarak kliniğin şiddetine göre 200 ug /kg doz İvermektin 1.2.8. günler 3 doz veya 1.2.8.9.15 günler 5 doz veya 1.2.8.9.15.22 ve 29 günler 7 doz olarak verilebilir.
Temaslı Kişi Tedavisi	Tek doz %5 Permetrin Topikal kullanımı

İvermektin tedavisi, topikal tedavi uygulayamayanlarda ve salgınlarda kitleleri tedavi etmek için ve AIDS'li hastalarda tercih edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezi (CDC), krutlu skabiyesde çoklu doz ivermektine ek olarak, %5 permetrin ve keratolitiklerin kombine edilerek kullanılmasını önermektedir [44]. İvermektin rezistansı literatürde tanımlanmaktadır. 5 yaş altı ve 15 kg'dan küçük çocuklar ve gebelerde kullanılması önerilmez. Laktasyon döneminde olan kadınlarda 14. gününde dahi sütte görüldüğü için uygulama sırasında emzirmenin kesilmesi önerilir. Bu gruplar risk altındaki toplumun önemli bir kısmını oluşturduğu için ivermektin tedavisinin etkinliğini kısıtlayan bir durumdur. Bu yüzden skabiyes için yeni tedavi arayışları devam etmektedir [45, 46]. Bu çalışmalar doğal ürünler ve özellikle veterinerlik alanında mevcut faydası bilinen ilaçlar üzerine yoğunlaşmaktadır.

Skabiyes Tedavisinde Potansiyel Tedaviler

Moxidexin

Veteriner hekimliği uygulamalarında kullanılan oldukça etkili bir skabisiddir. Lipofiliktir, yarılanma ömrü 20 gündür. Dolayısıyla akarın 14 günlük yaşam döngüsü sırasında, ovisidal etkinlik de gösterdiği için tek doz uygulama ile tedavi sağlama potansiyeline sahiptir. Moxidexin'in İvermektin ile karşılaştırıldığı hayvan çalışmalarında tek dozla krutlu skabiyesde etkinliği ve tedavisiz hayvanlardan reenfeksiyonu önlemesi ve daha az toksik olması dikkat çekicidir. Tedavide tek doz Moxidexin için optimal dozu belirleme çalışmaları devam etmektedir [47-49].

Benzoilfenil üre grubu ilaçlar

Fluazuron, sığır kenesi ve pire için piyasada bulunan benzoilfenil üre grubu bir akarisitir. Akarın büyüme faktör inhibisyonu ile bir sonraki evreye geçemeyen ve immatür kalan dişi akarın steril yumurtalar bırakması sağlanır. Memeliler için toksisitesi düşük ilaçlardır. Bu açıdan değerlendirildiği zaman, tedavide kullanılma potansiyeli taşımaktadır [50].

Skabiyes tedavisinde geleneksel olarak kullanılan bitkiler

Uyuz hastalığını konu alan bazı *in vitro* çalışmalar, biyokimyasal kullanım ve moleküler yaklaşımlar, akarların giderek daha dirençli hale geldiğini göstermiştir. Bu nedenle akarlardaki direnci tanımlama ihtiyacı yanında, gelecek vadeden yeni akarisit ajanların geliştirilmesi için yeni araştırmalara ve farklı yaklaşımlara ihtiyaç duyulduğunu ortaya koymaktadır. Bu açıdan bakıldığı zaman uyuz hastalığında geleneksel olarak kullanılan bitkiler ve bu bitkiler üzerinde yapılmış veya yapılacak olan bilimsel çalışmalar önem kazanmaktadır. Literatürde *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry'dan elde edilen karanfil tomurcuğu uçucu yağı, *Myristica fragrans* Houtt.'dan elde edilen küçük Hindistan cevizi uçucu yağı ve *Cananga odorata* (Lam.) Hook.f. & Thomson'dan elde edilen ylang ylang uçucu yağı ile neem yağı (*Azadirachta indica* A. Juss.; tespih ağacı, Hint leylağı), Peru balsamı (*Myroxylon balsamum* var. *pereire*)

ve huş ağacı katranı gibi doğal ürünler ile ilgili deneysel çalışmalar vardır [41] [51-54]. Bitkilerin skabiyeşte kullanılmasını doğrulayan bilimsel çalışmalar yanında, ülkemizde ve dünyada pek çok bitki, geleneksel olarak yerel halk tarafından tedavi edici etkisi nedeniyle kullanılmaktadır (Tablo 3).

Tablo 3. Uyuz hastalığı tedavisinde geleneksel olarak kullanılan bitkiler

Familiya, Bitkinin Latince adı	Kullanılan kısım	Hazırlama şekli	Kullanıldığı yer	Kaynak
Achariaceae				
<i>Hydnocarpus wightianus</i> Blume	Tohumları	Sabit yağı sürülerek uygulanır	Çin	[55]
Alliaceae				
<i>Allium cepa</i> L.	Toprak altı kısımları	Kükürt ile karıştırılıp cilde uygulanır	Türkiye	[56] [57]
<i>Allium sativum</i> L.	Toprak altı kısımları	Parçalandıktan sonra doğrudan vücuda sürülerek uygulanır	Hindistan	[41] [58]
Anacardiaceae				
<i>Mangifera indica</i> L.	Gövde kabuğu	Dekoksiyon	Endonezya Pakistan	[41] [59] [60] [61]
Apiaceae				
<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.	Toprak üstü kısımları	Merhem şeklinde sürülerek uygulanır	GÇT	[55]
<i>Daucus carota</i> L.	Kökleri	Yenerek kullanılır	Hindistan	[58] [59]
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Meyveleri	Ezilib <i>Coriandrum sativum</i> meyveleri ve şekerle karıştırılarak yenir	Hindistan	[58]
<i>Pimpinella anisum</i> L.	Meyveleri	Uçucu yağı sürülerek kullanılır	Pakistan	[40]
Apocynaceae				
<i>Nerium oleander</i> L.	Kök ve gövde kabukları	Yağda bekletilir bu yağ vücuda sürülür.	Hindistan, Pakistan	[55] [62]
<i>Nerium oleander</i> L.	Çiçekleri	Dekoksiyon	Türkiye	[63]
Arecaceae				
<i>Cocos nucifera</i> L.	Meyveleri	Sabit yağı limon meyvelerinin suyu ile karıştırılıp doğrudan hasarlı kısma uygulanır	Hindistan	[58]
Berberidaceae				
<i>Berberis lyceum</i> Royle	Kabukları	Dekoksiyonu içilir	Pakistan	[62]
Brassicaceae				
<i>Brassica juncea</i> (L.) Czern.	Tohumları	Sabit yağı	Hindistan	[58]
Convolvulaceae				
<i>Convolvulus arvensis</i> L.	Toprak üstü kısımları	Karabiberle karıştırılıp yenir	Pakistan	[62]
Cupressaceae				
<i>Juniperus oxycedrus</i> L. subsp. <i>oxycedrus</i>	Taze kozalakları	Ezilib haricen kullanılır	Türkiye	[64]
<i>Juniperus oxycedrus</i> L. subsp. <i>oxycedrus</i>	Katran	Haricen sürülerek uygulanır	Türkiye	[65]

Tablo 3 (devamı). Uyuz hastalığı tedavisinde geleneksel olarak kullanılan bitkiler

Familiya, Bitkinin Latince adı	Kullanılan kısım	Hazırlama şekli	Kullanıldığı yer	Kaynak
Euphorbiaceae				
<i>Acalypha</i> sp.	Kökleri ve yaprakları	Dekoksiyon	Afrika, Pakistan, Güney Doğu Asya	[40] [52]
<i>Emblica officinalis</i> Gaertn.	Meyveleri	Sıkılp elde edilen suyu şekerle karıştırılıp yenir	Hindistan	[58]
Fabaceae				
<i>Cajanus cajan</i> (L.) Millsp.	Tohumları	Parçalandıktan sonra doğrudan vücuda sürülerek uygulanır	Hindistan	[58]
<i>Indigofera spicata</i> Forssk	Yaprakları	Toz edilmiş yaprakları tere yağ ile karıştırılıp etkilenen yerlere masaj yapılarak uygulanır.	Etiyopya	[66]
<i>Saraca asoca</i> (Roxb.) Willd.	Çiçekleri	Hindistan cevizi yağı içinde kaynatılıp soğutulur. Krem şeklinde sürülerek uygulanır	Hindistan	[41] [59] [67]
<i>Vigna mungo</i> (L.) Hepper	Tohumları	Parçalandıktan sonra yenir	Hindistan	[58]
Gentianaceae				
<i>Swertia chirata</i> Buch.- Ham. ex Wall.	Yaprakları	Sıkılarak elde edilen suyu doğrudan vücuda uygulanır veya içilerek kullanılır	Hindistan	[58]
Juglandaceae				
<i>Juglans regia</i> L.	Tohumları	Tohumlar yakılır, külü kükürt ile karıştırılıp cilde uygulanır	Türkiye	[56]
Lamiaceae				
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill. .	Yaprakları	Uçucu yağı	Pakistan	[40] [59]
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Yaprakları	Uçucu yağı	Pakistan	[40] [41]
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Toprak üstü kısmaları	Uçucu yağı		[41] [68] [69]
Lauraceae				
<i>Cinnamomum verum</i> J.S. Presl.	Kabukları	Uçucu yağı zeytinyağı ile karıştırılıp sürülerek uygulanır	Pek çok yerde	[70]
Meliaceae				
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	Tohumları	Sabit yağı etkilenen bölgeye sürülerek kullanılır	Hindistan	[70]
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	Meyveleri	Ezilerken haricen kullanılır	Endonezya, Pakistan	[61] [62] [71]
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	Yaprakları	Dekoksiyon Kurutulmuş yapraklar zeytinyağı içinde bekletilip sürülerek kullanılır	Hindistan (Assam) Pakistan	[58] [61] [72]
Menyanthaceae				
<i>Menyanthes trifoliata</i> L.	Toprak üstü kısmaları	İnfüzyon şeklinde içilerek kullanılır	Çin	[55]

Tablo 3 (devamı). Uyuz hastalığı tedavisinde geleneksel olarak kullanılan bitkiler

Familiya, Bitkinin Latince adı	Kullanılan kısım	Hazırlama şekli	Kullanıldığı yer	Kaynak
Myrtaceae				
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.		Uçucu yağı gliserin ile karıştırılıp etkilenen yere sürülür		[59]
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M.Perry	Çiçek tomurcukları	Uçucu yağı Hindistan cevizi yağı ile karıştırılıp etkilenen yere sürülür	Avustralya, Hindistan, Pakistan	[30] [40]
Moraceae				
<i>Ficus carica</i> L.	Meyve lateksi	Sürülerek kullanılır	Filistin, Pakistan	[40] [41][59] [73]
Papaveraceae				
<i>Chelidonium majus</i> L.	Toprak üstü kısımları	İnfüzyon şeklinde haricen kullanılır	Avrupa	[55]
Phytolaccaceae				
<i>Phytolacca americana</i> L.	Kökleri	Dekoksiyon	Avrupa	[55]
<i>Phytolacca dodecandra</i> L'Herit	Yaprakları	Taze yaprakların sıklımasıyla elde edilen su cilt üzerine sürülür	Etiyopya	[66]
Pinaceae				
<i>Pinus brutia</i> Ten.	Katran	Haricen sürülür	Türkiye	[65]
<i>Pinus sylvestris</i> L.	Uçucu yağı	Zeytinyağı ile karıştırılıp sürülerek kullanılır	Avrupa, Türkiye	[55] [70]
Piperaceae				
<i>Piper nigrum</i> L.	Meyveleri	Ezildikten sonra sadeyağ ile karıştırıldıktan sonra yenir	Hindistan, Avrupa	[55] [58]
Plumbaginaceae				
<i>Plumbago europaea</i> L.	Toprak üstü kısımları	Dekoksiyonu kükürt ve limonla karıştırılıp vücuda sürülür	Türkiye	[56]
Polygonaceae				
<i>Rumex crispus</i> L.	Kökleri	Kabukları soyulup parçalanır ve yoğurtla karıştırılıp etkilenen yerlere sürülür	Türkiye	[57] [74]
Rhamnaceae				
<i>Rhamnus</i> sp.	Gövde kabukları	Dekoksiyon	Türkiye,	[75]
<i>Rhamnus prinoides</i> L'Hér.	Yaprakları	Dekoksiyon	Etiyopya	[66]
Rutaceae				
<i>Dictamnus albus</i> L.	Kökleri	Dekoksiyon	Çin	[55]
Solanaceae				
<i>Capsicum annuum</i> L.	Meyveleri	Parçalandıktan sonra doğrudan vücuda sürülerek uygulanır.	Hindistan (Assam); Pakistan	[40] [58]
<i>Datura stramonium</i> L.	Yaprakları	Tereyağ ile karıştırılıp cilde sürülerek uygulanır	Etiyopya	[66]
<i>Lycium barbarum</i> L.	Kaba parçalanmış veya toz edilmiş meyveleri	Dekoksiyon	Hint tıbbı	[55]
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	Meyveleri	Ezilerle elde edilen kısım Hindistan cevizi yağı ile karıştırılıp vücuda sürülür	Hindistan	[58]
Xanthorrhoeaceae				
<i>Aloe vera</i> (L.) Burm.f.	Yaprakları	Jeli doğrudan sürülerek kullanılır. Şurup şeklinde içilir	Nijerya, Pakistan	[40, 41] [55] [61] [76]

Tablo 3 (devamı). Uyuz hastalığı tedavisinde geleneksel olarak kullanılan bitkiler

Familya, Bitkinin Latince adı	Kullanılan kısım	Hazırlama şekli	Kullanıldığı yer	Kaynak
Vitaceae				
<i>Vitis vinifera</i> L.	Yaprak, meyve ve meyve suyu	Sürülerek kullanılır	Avrupa, Hindistan,	[55] [73]
Zingiberaceae				
<i>Curcuma longa</i> L.	Toprak altı kısımları	Sıkılarak elde edilen suyu süt ile karıştırılarak içilir. Tozu neem meyvelerinin ezilmesiyle elde edilen su ile karıştırılarak sürülür	Hindistan	[55] [58] [62]

Korunma Amaçlı Alınacak Önlemler

Skabiyesli kişilerin tedaviden önceki 3 gün içinde temas ettiği tüm giysiler, havlu ve nevresim gibi kişisel eşyalar makinede sıcak suyla (60 derecede en az 10 dakika) yıkanmalı veya kuru temizlemeye verilmelidir. Ütülenebilen ürünler ütülenmelidir. Yıkanamayacaklar kapalı bir plastik torba içinde 3-7 gün kadar ağzı kapatılarak dezenfekte edilmelidir. Mümkünse tedavinin 24 saati bitene kadar ortak tuvalet kullanılmamalıdır. Kurumsal salgınlara hızlı müdahale önemlidir. Hastanede skabiyesli hastaya değen tıbbi aletler sterilize edilmelidir. Krutlu skabiyesinde ortam elektrikli süpürge ile temizlenmelidir. Pestisit kullanımının ve evi ilaçlamanın bir faydası yoktur. Çocuklar ve yetişkinler tedaviden sonraki gün okula-işe gidebilir. Tedavi sonrası 2-4 hafta sonra akarlara karşı gelişen alerjik yanıt nedeniyle kaşıntı görülebilir. Tedavi verilen hastalar 2 hafta sonra çağırılarak kontrol edilmelidir. Kaşıntı varsa reinfestasyon, allerji, postskabiyetik egzama açısından değerlendirilmelidir. Semptom veya komplikasyon durumunda tekrar antiskabisidal tedavi, topikal steroid uygulaması, antibiyotikler veya antihistaminikler ile tedavi takip edilmelidir [77].

Modelleme çalışmaları, olası bir aşının epidemik koşullarda etkin olacağı yönünde umut vaat etse de, henüz skabiyes tedavisinde kullanılan profilaktik bir tedavi ya da aşı yoktur [78]. Bu sebeple reinfestasyonları ve yayılımı önlemek açısından alınacak en önemli tedbir hijyendir.

Skabiyes tedavisinde başarı; doğru uygulanmış bir skabisidal tedavi yanında, semptom ve komplikasyonları da yönetebilen ve koruyucu önlemlerin de tedavinin bir parçası olduğu bir modelle mümkündür. Skabiyes tedavisinde sınırlı sayıda kullanılan ilaçların mevcut kısıtlılıkları nedeniyle yeni ilaç araştırmalarına ihtiyaç duyulduğu aşikardır. Dünya çapında 200-300 milyon insanı etkilediği tahmin edilen skabiyesinde, yukarıda da söz edilen klinikte kullanılan bitkisel kökenli (Permetrin, Benzil benzoat, Çay ağacı uçucu yağı) ilaçlar yanında pek çok bitki de geleneksel olarak yerel halk tarafından tercih edilmektedir [70]. Tablo 3’de verildiği gibi 49 farklı takson ülkemizde ve dünyanın değişik kısımlarında yerel halk tarafından, uyuz hastalığını tedavi etmek için farklı bitki kısımlarından hazırlanan ürünleri kullanılmaktadır. Geleneksel kullanımdan hareketle bilimsel çalışmaların yönlendirilmesi, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile elde edilecek verilerin klinik çalışmalarla desteklenmesi, tedavide kullanılabilecek yeni ilaç formülasyonlarının tasarlanabilir hale gelmesini mümkün kılacaktır. Son yıllarda ülkemizde

de görülme sıklığı artan bu global hastalığın tedavisinde model oluşturacak bitkisel kökenli bir hammaddenin tedaviye girebilmesi, halk sağlığı ve ülkemiz ekonomisi açısından değerli olacaktır.

YAZAR KATKILARI

Kavram: A.K.; Tasarım: J.A.; Denetim: J.A., A.K.; Kaynaklar: J.A., A.K.; Veri Toplama ve/veya işleme: J.A., A.K.; Analiz ve/veya yorumlama: J.A., A.K.; Literatür taraması: J.A., A.K.; Makalenin yazılması: J.A., A.K.; Kritik inceleme: A.K.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Ramos-e-Silva, M. (1998). Giovan Cosimo Bonomo (1663-1696): discoverer of the etiology of scabies. *International Journal of Dermatology*, 37(8), 625-630. [CrossRef]
2. Thomas, C., Coates, S.J., Engelman, D., Chosidow, O., Chang, A.Y. (2020). Ectoparasites: scabies. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 82(3), 533-548. [CrossRef]
3. Jackson, R. (2004). Scabies by Kenneth Mellanby. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 8(2), 73-76. [CrossRef]
4. World Health Organization, Web cite (2020). From <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/scabie> Erişim Tarihi: 10.09.2020
5. Wang, C.H., Lee, S.C., Huang, S.S., Kao, Y.C., See, L.C., Yang, S.H. (2012). Risk factors for scabies in Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 45(4), 276-280. [CrossRef]
6. Ciftci, I.H., Karaca, S., Dogru, O., Cetinkaya, Z., Kulac, M. (2006). Prevalence of pediculosis and scabies in preschool nursery children of Afyon, Turkey. *The Korean Journal of Parasitology*, 44 (1), 95-98. [CrossRef]
7. Çetinkaya, Ü., Şahin, S., Ulutabanca, R. (2018). The epidemiology of scabies and pediculosis in Kayseri. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, 42(2), 134-137. [CrossRef]
8. Thomas, J., Peterson, G.M., Walton, S.F., Carson, C.F., Naunton, M., Baby, K.E. (2015). Scabies: an ancient global disease with a need for new therapies. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), 250. [CrossRef]

9. GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators (2017). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*, 390(10100), 1211-1259. [CrossRef]
10. Cinotti, E., Perrot, J.L., Labeille, B., Maguet, H., Couzan, C., Flori, P., Cambazard, F. (2015). Inefficacy of alcohol-based hand rub on mites in a patient with hyperkeratotic scabies. *Clinical and Experimental Dermatology*, 40(2), 177-181. [CrossRef]
11. Hicks, M.I., Elston, D.M. (2009). Scabies. *Dermatologic Therapy*, 22(4), 279-292. [CrossRef]
12. Kazan, D., Demirsoy, E.O. Skabiyes; klinik bulgular, tani ve tedavi. *Acta Medica Nicomedia*, 3(2),80-87, from https://dergipark.org.tr/en/pub/actamednicomedia/issue/55284/734237#article_cite Erişim tarihi 27.11.2020
13. Şimşek, E., Keskin, A., Dağcıoğlu, B.F. (2019). Sık rastlanan ve sık atlanan hastalık uyuz: olgu sunumu. *Ankara Medical Journal*, 19(1), 205-209. [CrossRef]
14. Shimose, L., Munoz-Price, L.S. (2013). Diagnosis, prevention, and treatment of scabies. *Current Infectious Disease Reports*, 15(5), 426-431. [CrossRef]
15. Tai, D.B.G., Abu Saleh, O., Miest, R. (2020). Genital nodular scabies. *IDCases*, 22, e00947. [CrossRef]
16. Çetin, B.Ş. (2017). Uyuz hastalığına yaklaşım (güncel kılavuz değerlendirmesi). *Cocuk Enfeksiyon Dergisi*, 11(2), 107-109. [CrossRef]
17. Leung, A.K.C., Lam, J.M., Leong, K.F. (2020). Scabies: a neglected global disease. *Current Pediatric Reviews*, 16(1), 33-42. [CrossRef]
18. Micali, G., Lacarrubba, F., Verzi, A.E., Chosidow, O., Schwartz, R.A. (2016). Scabies: advances in noninvasive diagnosis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(6), e0004691. [CrossRef]
19. Roncalli, R.A. (1987). The history of scabies in veterinary and human medicine from biblical to modern times. *Veterinary Parasitology*, 25 (2), 193-198. [CrossRef]
20. Johnstone, P., Strong, M. (2014). Scabies. *BMJ Clinical Evidence*, 1707, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4278180/> Erişim tarihi 10.11.2021
21. Medscape Web cite (2020). From <https://emedicine.medscape.com/article/1109204-treatment#d1> Erişim Tarihi: 13.09.2020
22. Goodman, L.S., Gilman, A., Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L. (2009). *Goodman and Gilman Tedavinin Farmakolojik Temeli*, (J. S. L. Laurence L.Brunton, Keith L Parker, Eds.), pp. 1691-1692, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti.
23. Karthikeyan, K. (2007). Scabies in children. *Archives of Disease in Childhood: Education & Practice Edition*, 92(3), ep65-69. [CrossRef]
24. Taplin, D., Porcelain, S.L., Meinking, T.L., Athey, R.L., Chen, J.A., Castillero, P.M., Sanchez, R. (1991). Community control of scabies: a model based on use of permethrin cream. *The Lancet*, 337(8748), 1016-1018. [CrossRef]

25. Dressler, C., Rosumeck, S., Sunderkötter, C., Werner, R.N., Nast, A. (2016). The treatment of scabies. *Deutsches Ärzteblatt International*, 113(45), 757-762. [CrossRef]
26. MedlinePlus Web cite (2020). From <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a698037.html> Erişim Tarihi: 24.02.2020
27. Drago, B., Shah, N.S., Shah, S.H. (2014). Acute permethrin neurotoxicity: Variable presentations, high index of suspicion. *Toxicology Reports*, 01, 1026-1028. [CrossRef]
28. Yang, P.-Y., Lin, J.-L., Hall, A. H., Tsao, T.C., Chern, M.-S. (2002). Acute ingestion poisoning with insecticide formulations containing the pyrethroid permethrin, xylene, and surfactant: a review of 48 cases. *Journal of toxicology: Clinical Toxicology*, 40(2), 107-113. [CrossRef]
29. Khalil, S., Abbas, O., Kibbi, A.G., Kurban, M. (2017). Scabies in the age of increasing drug resistance. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(11), e0005920. [CrossRef]
30. Pasay, C., Walton, S.F., Fischer, K., Holt, D., McCarthy, J. (2006). PCR-based assay to survey for knockdown resistance to pyrethroid acaricides in human scabies mites (*Sarcoptes scabiei* var *hominis*). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(4), 649-657. [CrossRef]
31. Kayaalp, O. (2009). *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* (12 ed.), pp. 291-293.
32. Salavastru, C.M., Chosidow, O., Boffa, M.J., Janier, M., Tiplica, G.S. (2017). European guideline for the management of scabies. *The Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 31(8), 1248-1253. [CrossRef]
33. Drugs.com Web cite (2020). From <https://www.drugs.com/cons/benzyl-benzoate-topical.html> Erişim Tarihi: 10.10.2021
34. Uptodate Web cite (2021). From https://www.uptodate.com/contents/malathion-drug-information?topicRef=114369&source=see_link Erişim Tarihi: 10.10.2021
35. The Emperor's Itch. The Legend Concerning Napoleon's Affliction with Scabies. (1940). *Bulletin of the Medical Library Association*, 29(1), 63-63. [CrossRef]
36. Sharquie, K.E., Al-Rawi, J.R., Noaimi, A.A., Al-Hassany, H.M. (2012). Treatment of scabies using 8% and 10% topical sulfur ointment in different regimens of application. *Journal of Drugs in Dermatology*, 11(3), 357-364, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22395587/> Erişim tarihi: 14.08.2021
37. Dermiton İlaç Bilgisi Web cite (2020). From; <http://berkoilac.com.tr/wp-content/uploads/2017/07/dermiton-kt-revG-onayli.pdf> Erişim Tarihi: 10.12.2020
38. Nolan, K., Kamrath, J., Levitt, J. (2012). Lindane toxicity: a comprehensive review of the medical literature. *Pediatric Dermatology*, 29(2), 141-146. [CrossRef]
39. Humphreys, E.H., Janssen, S., Heil, A., Hiatt, P., Solomon, G., Miller, M.D. (2008). Outcomes of the California ban on pharmaceutical lindane: clinical and ecologic impacts. *Environmental Health Perspectives*, 116(3), 297-302. [CrossRef]

40. Akram, M., Riaz, M., Noreen, S., Shariati, M.A., Shaheen, G., Akhter, N., Parveen, F., Akhtar, N., Zafar, S., Owais Ghauri, A., Riaz, Z., Khan, F.S., Kausar, S., Zainab, R. (2020). Therapeutic potential of medicinal plants for the management of scabies. *Dermatology Therapy*, 33(1), e13186. [\[CrossRef\]](#)
41. Thomas, J., Carson, C.F., Peterson, G.M., Walton, S.F., Hammer, K.A., Naunton, M., Davey, R.C., Spelman, T., Dettwiller, P., Kyle, G., Cooper, G.M., Baby, K.E. (2016). Therapeutic potential of tea tree oil for scabies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(2), 258-266. [\[CrossRef\]](#)
42. Goodman, L.S., Gilman, A., Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L. (2009). *Tedavinin Farmakolojik Temeli* (J. S. L. Laurence L. Brunton, Keith L Parker, Eds.), pp. 1084-1087, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd.Şti.
43. Strong, M., Johnstone, P. (2007). Interventions for treating scabies. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2007(3), Cd000320. [\[CrossRef\]](#)
44. Hay, R.J., Steer, A.C., Engelman, D., Walton, S. (2012). Scabies in the developing world--its prevalence, complications, and management. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(4), 313-323. [\[CrossRef\]](#)
45. Mounsey, K.E., McCarthy, J.S., Walton, S.F. (2013). Scratching the itch: new tools to advance understanding of scabies. *Trends in Parasitology*, 29(1), 35-42. [\[CrossRef\]](#)
46. Thomas, J., Peterson, G.M., Walton, S.F., Carson, C.F., Naunton, M., Baby, K.E. (2015). Scabies: an ancient global disease with a need for new therapies. *BMC Infectious Diseases*, 15(250) [\[CrossRef\]](#)
47. Mounsey, K.E., Bernigaud, C., Chosidow, O., McCarthy, J.S. (2016). Prospects for Moxidectin as a New Oral Treatment for Human Scabies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), e0004389. [\[CrossRef\]](#)
48. Prichard, R., Ménez, C., Lespine, A. (2012). Moxidectin and the avermectins: consanguinity but not identity. *International Journal for Parasitology Drugs and Drug Resistance*, 14(2), 134-153. [\[CrossRef\]](#)
49. Talaga-Ćwiertnia, K. (2021). Sarcoptes infestation. what is already known, and what is new about Scabies at the beginning of the third decade of the 21st Century? *Pathogens*, 10(7). [\[CrossRef\]](#)
50. Pasay, C., Rothwell, J., Mounsey, K., Kelly, A., Hutchinson, B., Miezler, A., McCarthy, J. (2012). An exploratory study to assess the activity of the acarine growth inhibitor, fluazuron, against *Sarcoptes scabiei* infestation in pigs. *Parasites & Vectors*, 5,40. [\[CrossRef\]](#)
51. Mumcuoglu, K. Y., Gilead, L. (2008). Treatment of scabies infestations. *Parasite*, 15(3), 248-251. [\[CrossRef\]](#)
52. Seebaluck, R., Gurib-Fakim, A., Mahomoodally, F. (2015). Medicinal plants from the genus *Acalypha* (Euphorbiaceae)--a review of their ethnopharmacology and phytochemistry. *Journal of Ethnopharmacology*, 15(159), 137-157. [\[CrossRef\]](#)

53. Riebenbauer, K., Weber, P. B., Haitel, A., Walochnik, J., Valencak, J., Meyersburg, D., Kinaciyan, T., Handisurya, A. (2022). Comparison of permethrin-based treatment strategies against scabies in infants and young children. *The Journal of Pediatrics*. Feb 14. pii: S0022-3476(22)00115-9. [\[CrossRef\]](#)
54. Corrigendum to "Therapeutic potential of medicinal plants for the management of scabies". (2021). *Dermatologic Therapy*, 34(4), e15027. [\[CrossRef\]](#)
55. Company, M. E. (2000). *PDR for Herbal Medicines*. 2nd ed. Montvale, NJ.
56. 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. [\[CrossRef\]](#)
57. Günbatan, T., Gürbüz, İ., Özkan, A.M.G. (2016). The current status of ethnopharmacobotanical knowledge in Çamlıdere (Ankara, Turkey). *Turkish Journal of Botany*, 40(3), 241-249. [\[CrossRef\]](#)
58. Saikia, A.P., Ryakala, V.K., Sharma, P., Goswami, P., Bora, U. (2006). Ethnobotany of medicinal plants used by Assamese people for various skin ailments and cosmetics. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(2), 149-157. [\[CrossRef\]](#)
59. Tabassum, N., Hamdani, M. (2014). Plants used to treat skin diseases. *Pharmacogn Rev*, 8(15), 52-60. [\[CrossRef\]](#)
60. Khan, N., Khushtar, M., Ahmad, N., Hasan, N., Khan, Z., Idris, S., Ahmad, A., Zishan, M. (2017). Nutritional importance and pharmacological activity of *Mangifera indica*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6, 258-273. [\[CrossRef\]](#)
61. Kumalasari, M., Marwing, A., Kususmawati, E., Mustika, I., Lusiana, N., Widayanti, L., Andiarna, F., Andyarini, E., Hidayati, S. (2020). Development of Extract of Herbal Plants as Anti-Scabies in Pesantren. *Proceedings of the 19th Annual International Conference on Islamic Studies, AICIS 2019, 1-4 October 2019, Jakarta, Indonesia* [\[CrossRef\]](#)
62. Alamgeer, Sharif, A., Asif, H., Younis, W., Riaz, H., Bukhari, I. A., Assiri, A. M. (2018). Indigenous medicinal plants of Pakistan used to treat skin diseases: a review. *Chinese Medical Journal*, 13, 52. [\[CrossRef\]](#)
63. Emre, G., Dogan, A., Haznedaroglu, M.Z., Senkardes, I., Ulger, M., Satiroglu, A., Emmez, B. C., Tugay, O. (2021). An ethnobotanical study of medicinal plants in Mersin (Turkey). *Frontiers in Pharmacology*, 12, 664500. [\[CrossRef\]](#)
64. Koçyiğit, M., Özhatay, N. (2006). Wild plants used as medicinal purpose in Yalova (northwest Turkey). *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(2) 91-103, from <https://www.turkjps.org/archives/archive-detail/article-preview/wld-plants-used-as-medcnal-purpose-in-yalova-north/12564> Erişim tarihi 15.02.2022
65. Çakır, E.A. (2017). A comprehensive review on Ethnomedicinal utilization of gymnosperms in Turkey. *Eurasian Journal of Forest Science*, 5(1), 35-47. [\[CrossRef\]](#)
66. Nigussie, G. (2021). A review on traditionally used medicinal plants for scabies therapy in Ethiopia. *Advances in Traditional Medicine*, 21(2), 199-208. [\[CrossRef\]](#)

67. Kingston, C., Jeeva, S., Jeeva, G., Kiruba, S., Mishra, B., Kannan, D. (2009). Indigenous knowledge of using medicinal plants in treating skin diseases in Kanyakumari district, Southern India. from <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/3966> Erişim tarihi 12.02.2021
68. Basch, E., Ulbricht, C., Hammerness, P., Bevins, A., Sollars, D. (2004). Thyme (*Thymus vulgaris* L.), thymol. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 4(1), 49-67. [\[CrossRef\]](#)
69. Uritu, C.M., Mihai, C.T., Stanciu, G.-D., Dodi, G., Alexa-Stratulat, T., Luca, A., Leon-Constantin, M.-M., Stefanescu, R., Bild, V., Melnic, S. (2018). Medicinal plants of the family Lamiaceae in pain therapy: a review. *Pain Research and Management*, 2018, 7801543. [\[CrossRef\]](#)
70. Demirezer, L., Ersöz, T., Saraçoğlu, İ., Şener, B., Köroğlu, A., Yalçın, F. (2021). *A'dan Z'ye Tıbbi Yağlar ve Aromatik Sular*. Hayykitap-810, Hayat Güzeldir-99, İstanbul
71. Murniati, A., Rohmawati, I. (2018). The influence of using extract neem leaf (*azadirachta indica* A. juss) soap in the scabies lesions grade II Healing. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences*, 4(3), 140-146. [\[CrossRef\]](#)
72. Ayaz, S., Hannan, A., Usmanhane, K., Nazar, H., Mohiuddin, E., Akram, M., Khan, M.I. (2011). ScaNeem: Herbo-mineral therapy for scabies. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(24), 5706-5712. [\[CrossRef\]](#)
73. Badgujar, S.B., Patel, V.V., Bandivdekar, A.H., Mahajan, R.T. (2014). Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Ficus carica*: A review. *Pharmaceutical Biology*, 52(11), 1487-1503. [\[CrossRef\]](#)
74. Yeşilada, E., Sezik, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., Tanaka, T. (1999). Traditional medicine in Turkey IX:: Folk medicine in north-west Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3), 195-210. [\[CrossRef\]](#)
75. Sezik, E., Tabata, M., Yesilada, E., Honda, G., Goto, K., Ikeshiro, Y. (1991). Traditional medicine in Turkey I. Folk medicine in northeast Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 35(2), 191-196. [\[CrossRef\]](#)
76. Oyelami O.A., Onayemi A., Oyedeji O.A., Adeyemi L.A. (2009). Preliminary study of effectiveness of aloe vera in scabies treatment. *phytotherapy research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(10), 1482-1484. [\[CrossRef\]](#)
77. Centers for Disease Control and Prevention, Web cite (2020). From <https://www.cdc.gov/parasites/scabies/prevent.html> Erişim Tarihi: 20.09.2021
78. Bhunu, C.P., Mushayabasa, S., Monera, T.G. (2013). Assessing the impact of vaccination on controlling the spread of human scabies. *ISRN Computational Biology*, 2013, 362973. [\[CrossRef\]](#)



TREATMENT OF BEHÇET'S DISEASE AND CURRENT APPROACHES

BEHÇET HASTALIĞININ TEDAVİSİ VE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR

Gözde YENİCE ÇAKMAK^{1*} , Ahmet Özer ŞEHİRLİ² 

¹Trakya University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, 22030, Edirne, Turkey, e-mail: gozdeyenice@trakya.edu.tr

²Near East University, Faculty of Dentistry, Department of Pharmacology, 99138, Nicosia-6 Turkish Republic of North Cyprus, e-mail: ahmetozer.sehirli@neu.edu.tr

ABSTRACT

Objective: Behçet's Disease (BD) is a multisystemic inflammatory disease which courses with relapses and characterized by four major symptoms of oral aphthous ulcers, genital ulcers, skin lesions and ocular lesions; and five minor symptoms including joint involvement, gastrointestinal ulcers, epididymitis, vascular lesions and neurological involvement. Treatment in BD varies according to the clinical course of age at which the disease begins, gender, the organs involved and the clinical course of the disease; therefore, it should be performed according to the person and the symptoms. While empirical treatment of BD is still continuing; recently, effective protocols have been implemented due to the pathogenesis of the underlying disease that is better defined and many broad-spectrum therapeutic agents have been presented for the treatment. This review is presented to bring together the specific treatment procedures applied during the progression of the disease.

Result and Discussion: Although there is no specific treatment strategy for BD, which is an inflammatory disease characterized by local and systemic involvements, treatment procedures range from local corticosteroids to monoclonal antibodies, determined by the type and severity of symptoms. Studies are still continuing on diseases affecting the vascular and gastrointestinal system in BD. Conventional immunosuppressive agents, including corticosteroids, colchicine and azathioprine, and cyclosporine are used in the treatment of BD. Recently, tumor necrosis factor (TNF) inhibitors have become available for a variety of rheumatic diseases, and published data indicate that TNF inhibitors represent a significant therapeutic advance for patients with severe and resistant disease as well as those with contraindications or intolerance to these therapies.

Keywords: Behçet's Disease, glucocorticoids, anti-TNF- α , mucocutaneous ulceration, major organ involvements

ÖZ

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Gözde Yenice Çakmak
e-mail / e-posta: gozdeyenice@trakya.edu.tr, Phone / Tel.: +905396393552

Amaç: Behçet Hastalığı (BH), nökslerle seyreden, oral aft, genital ülser, deri lezyonları ve oküler lezyonlar olmak üzere dört majör bulgu ve eklem tutulumu, gastrointestinal ülserler, epididimit, vasküler lezyonlar ve nörolojik tutulum dahil olmak üzere beş minör bulguyla karakterize multisistemik inflamatuvar bir hastalıktır. BH' de tedavi hastalığın başladığı yaşa, cinsiyete, tutulan organlara ve hastalığın klinik seyrine göre değişir; bu nedenle tedavi kişiye ve semptomlara göre yapılmalıdır. BH' nin ampirik tedavisi halen devam ederken; son zamanlarda altta yatan hastalığın patogenezinin daha iyi tanımlanması nedeniyle etkili protokoller uygulanmış ve tedavi için birçok geniş spektrumlu terapötik ajan sunulmuştur. Bu derleme, hastalığın progresyonu döneminde uygulanan spesifik tedavi prosedürlerini bir araya getirme hedefiyle ortaya koyulmuştur.

Sonuç ve Tartışma: Lokal ve sistemik tutulumlar ile karakterize inflamatuvar bir hastalık olan BH'nin belirli bir tedavi stratejisi olmamakla beraber; tutulumlara yönelik tedavi, semptomların tipi ve şiddetine göre belirlenen lokal kortikosteroidlerden monoklonal antikorlara kadar değişir. BH' de görülen vasküler ve gastrointestinal sistemi etkileyen tutulumlar üzerinde halen çalışmalar devam etmektedir. BH tedavisinde kortikosteroidler, kolşisin ve azatiyoprin ve siklosporin dahil olmak üzere geleneksel immünosupresif ajanlar kullanılmaktadır. Son zamanlarda, tümör nekroz faktörü (TNF) inhibitörleri, çeşitli romatizmal hastalıklar için kullanılabilir hale gelmiş ve yayınlanmış veriler, TNF inhibitörlerinin, ciddi ve dirençli hastalığı olan hastaların yanı sıra bu tedavilere karşı kontrendikasyonları veya intoleransı olan hastalar için önemli bir terapötik ilerlemeyi temsil ettiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Behçet Hastalığı, glukokortikoidler, anti-TNF- α , mukokutenöz ülserasyon, majör organ tutulumları

INTRODUCTION

Behçet's Disease (BD) is a chronic, multisystem inflammatory disease with an involvement both arteries and veins of all sizes. The unknown aetiology of the disease is characterized by manifestations such as oral aphthous ulcers, genital ulcers, skin lesions, ocular lesions, and others.

Pathophysiology

It is thought that both genetic and environmental triggers play a role in mediating the development of the disease. In recent studies, the immunogenetic findings have shown a clue to the development and progression of the disease, albeit the pathogenesis of the disease is still unknown.

Genetic Factors

As the strongest genetic factor, human leukocyte antigen (HLA)-B51 was extensively identified about half century ago. Recently, additional independent factors in the major histocompatibility complex class I region have been identified; HLA-B*15, -B*27, -B*57 and -A*26 as risk factors, and HLA-B*49 and -A*03 as protectives. MHC class I related gene (MIC) and tumour necrosis factor (TNF) genes, located in the MHC locus, are thought to play a role in the pathogenesis of BD. According to recent studies, the relationship between BD and genes encoding common variants of interleukin (IL) -10, interleukin-23 receptor (IL23R) and encoding interleukin 12 receptor beta (IL12RB2) outside the MHC locus has been identified. IL-23, an inflammatory cytokine, plays a key role in stimulating the proliferation of T-helper 17 (Th17), which is also responsible to produce other inflammatory cytokines triggering the formation of disease involvements. IL-10 exerts anti-inflammatory effects and regulates the release of a few pro-inflammatory cytokines [1].

Environmental Factors

Environmental factors that trigger BD are both viral infectious agents, including herpes simplex virus I, hepatitis viruses and parvovirus B19, and bacterial factors, including mycobacter, *Borrelia burgdorferi*, *Helicobacter pylori*, and various streptococcal agents [2]. Heat shock proteins (HSP) appear to be the common feature in different infectious agents, and it is assumed that their similarities with human homologues may trigger the immune response by causing cross-reactions [3].

Immunologic Factors

T cells, neutrophils, and antigen-presenting cells (APCs) have a crucial role in the pathogenesis of BD. APCs are responsible for enhancing the response of the T helper 1 (Th1) with cytokines by stimulating neutrophil hyperactivity. In addition, specifically in acute symptoms, the essential role of Th17 and interleukin (IL) -17 pathways have been revealed in the pathogenesis of disease. Elevated neutrophil activation in BD, causes neutrophil and lymphocyte infiltration in the affected organs of patients. Certain levels of TNF- α , interferon- γ , IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, IL-17, IL-21 and IL-23 have been reported in the sera of patients of BD and has been associated with the disease [1, 3].

Toll-like receptors (TLRs) are key proteins of the innate immune system. The detection of elevated TLR2, TLR3, TLR4, and TLR8 expression levels in patients suffering from BD suggests that TLRs may be associated with immunopathogenesis of BD [1, 3].

Another finding of neutrophil hyperactivity and the increased levels of proteins such as myeloperoxidase, superoxide dismutase and nitric oxide in BD patients suggests that they may play a role in the pathogenesis of the disease [4].

Generally, the main goal of the treatment is to relieve the symptoms, to suppress the inflammation, to prevent or reduce the tissue damage, to decrease frequency and severity of the attacks, and to avoid the future complications for the disease [3].

Treatment

Treatment in BD varies according to the age of onset, gender, the organs involved, and the clinical course of the disease; therefore, it should be performed according to the patient and the symptoms. For instance, the treatment procedure quite aggressive in a male patient with BD from an early age, who has severe eye disorders, vascular, neurological, and gastrointestinal manifestations, while the treatment of a patient with oral and mucosal involvements is more conservative. Recently, effective protocols have been implemented due to the pathogenesis of the underlying disease that is better defined and many broad-spectrum therapeutic agents have been presented for the treatment. However, none of these methods provides complete cure of the disease [5]. The following table (**Table**

1) lists BD's treatment procedures based on the manifestations of the disease.

Table 1. Organ based therapy procedures in the management of BD [6].

Manifestation		Treatment
Mucocutaneous manifestations	-Oral aphthae and genital ulcers	<p>Initial Treatment</p> <ul style="list-style-type: none"> • Triamcinolone acetonide cream (0.1 % Orabase), 3-4 times/ day [7] • Topical corticosteroids (for genital ulcers) or/ and Topical sucralfate (1g/5mL 4 times/ day as a mouthwash) [8] <p>Recurrent Oral and Genital Ulcers</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colchicine (1-2mg/ day in divided doses) • Apremilast (10 mg/ day for six days for up-titration, then 30 mg twice daily) • Systemic glucocorticoids (prednisone, initial dose of 15 mg/ day in the first week; then 10 mg/ day until discontinuation of the drug for two to three weeks) • Azathioprine (50 mg/day as starting dose, increasing by 50 mg every 4 weeks until the target dose of 2.5 mg/kg/day is reached) • TNFα inhibitors (infliximab, adalimumab, or etanercept) [9-11] • Cyclosporine (10 mg/ kg/ day in divided doses) [12] • Interferon alfa (3-6 million units 3 times, weekly) [13] • Thalidomide (limited use due to neuropathy and teratogenicity adverse effects) [14]
	Cutaneous lesions	<ul style="list-style-type: none"> • Colchicine (1-2 mg/ day in divided doses, for mild lesions) • Prednisone (up to 40 mg daily as starting dose for colchicine-resistant symptoms)
Arthritis		<ul style="list-style-type: none"> • Colchicine 1-2 mg/day in divided doses • Nonsteroidal Antiinflammatory drugs (NSAIDs) (for pain management) <p>For severe symptoms,</p> <ul style="list-style-type: none"> • Azathioprine and/or TNF-α inhibitors • Interferon-α/ methotrexate • Apremilast (in symptoms unresponsive to colchicine)
Ocular disease	Anterior uveitis	<ul style="list-style-type: none"> • Topical corticosteroids and drops including scopolamine (0.25%) or cyclopentolate (1%). <p>For refractory symptoms</p> <ul style="list-style-type: none"> • Systemic corticosteroids (prednisone 40 mg/day as an initial dose, might be discontinued within a month)
	Posterior uveitis	<p>Initial Therapy</p> <ul style="list-style-type: none"> • Azathioprine and glucocorticoids [15-17] • Azathioprine and TNF-α inhibitors (for sight- threatening uveitis) <p>More severe cases</p> <ul style="list-style-type: none"> • Prednisone 1 mg/ kg/ day for a month • Methyprednisolone (1 g/ day for three days) (for sight- threatening uveitis) [18- 21] • Triamcinolone (for panuveitis, for 2-6 months) [22] • Systemic glucocorticoids <ul style="list-style-type: none"> • Azathioprine (initial dose 50 mg/day, increasing by 50 mg every four weeks up to 2.5 mg/kg/day)

Table 1 (continued). Organ based therapy procedures in the management of BD [6].

Manifestation		Treatment
Ocular disease	Posterior uveitis	<ul style="list-style-type: none"> • TNF-α inhibitors (In cases inadequate or unresponsive to azathioprine, or in refractory cases) [23-25] <ul style="list-style-type: none"> ○ Infliximab (5 mg/kg at 0, 4, 8, 16, and 24 weeks or 0, 2, 6, and every 8 weeks) ○ Adalimumab (80 mg as a loading dose, 40 mg after one week, and 40 mg following every two weeks) • Cyclosporine (2-5 mg/ kg/ day) may be combined with azathioprine and corticosteroids [26- 31]. • Interferon alfa-2a (3-6 million units 3 times, weekly) [32- 37] • Cyclophosphamide (500 mg/ m² to 1 g/ m² of body surface area (BSA) monthly/ 6 months or 2-3 mg/ kg/ day orally.) • Methotrexate (15 mg/ week as an initial dose, increasing up to 25 mg/ week) • Mycophenolate mofetil (500 mg twice daily, after a few days the dose is increased to 1000-1500 mg twice daily) • Rituximab (1000 mg on 1st and 15th days, and repeated every six months) [38] • Intravitreal glucocorticoid implants [39-41]
Gastrointestinal disease		<ul style="list-style-type: none"> • Glucocorticoid combined with azathioprine (prednisone 0,5-1 mg/ kg/day as an initial dose, azathioprine starting with 50 mg daily, in every four weeks it increased by 50 mg up to 2,5 mg/ kg/day) [42] • TNF-α inhibitors combined with azathioprine <ul style="list-style-type: none"> ○ Infliximab (5mg/kg on weeks 0, 2, and 6, then 5 mg/kg every 8 weeks.) • TNF-α inhibitors combined with sulfasalazine • Mycophenolate and methotrexate
Renal Disease		<p>There is no specific treatment regimen for mild nephritis.</p> <p>AA (secondary) amyloidosis</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colchicine 1-1.2 mg/day
Vascular Disease		<p>Large artery disease</p> <ul style="list-style-type: none"> • High-dose glucocorticoids combined cyclophosphamide [19] <p>Venous thrombosis</p> <ul style="list-style-type: none"> • Glucocorticoids plus immunosuppressive agent (same procedure used in posterior uveitis)
Neurological Disease		<ul style="list-style-type: none"> • Azathioprine (commonly used) • Mycophenolate mofetil • Methotrexate • Cyclophosphamide • TNF-α inhibitor (Infliximab)

Topical Treatment

Patients suffering only from skin, mucosal and joint involvement can be treated with topical corticosteroid applications in cream, mouthwash, or spray form. The treatment procedure is determined by the severity and frequency of the lesions and the perceptions and preferences of the patients. Topical sucralfate suspension is also an alternative treatment for aphthous ulcerations.

Similarly, genital ulcers also respond to topical corticosteroid medication. However, long-term use of these drugs causes skin atrophy. Larger (major) oral and genital ulcerations can be treated by intralesional triamcinolone acetonide injection. Lidocaine gel, chlorhexidine mouthwash, silver nitrate rod, amlexanox, and tetracycline mouthwashes are other topical agents have been found beneficial in the treatment of oral ulcers. For mild eye involvements, the use of topical mydriatic agents, and eye drops with corticosteroid may be effective [43].

Systemic Treatment

Glucocorticoids (GC)

Glucocorticoids (GC) are the most preferred group of drugs for the therapy regimens of many inflammatory and immune diseases. Although corticosteroids successfully reduce acute inflammation, they often fail to prevent relapses alone. Therefore, glucocorticoids are combined with other immunosuppressive agents such as colchicine, interferone- α (IFN- α), cyclosporine or azathioprine (AZA) in treatments [44, 45]. Additionally, combined treatment regimens cause to reduce the total dose of corticosteroids [45].

Corticosteroids are preferred in the treatment of moderate to severe manifestations of BD. Intravenous corticosteroids are frequently used in acute relapses of mucocutaneous, ophthalmic and neurological involvement, and progressive thrombophlebitis. However, these agents are known to be effective in acute relapses; there is no data of their effect on the control of disease progression [46].

The mechanism of action of GC is manifested by its binding with the glucocorticoid receptor (GR). Following receptor ligand formation, the GR-GC complex is transferred to the nuclear domain to trigger transactivation or transrepression processes of the target gene [46]. Therefore, it reduces the inflammatory response by suppressing various inflammatory cytokines such as IL- 1, IL- 2, IL- 6, IL- 8, TNF, and granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GMCSF), as well as interfering with leukocyte migration [47].

Colchicine (COL)

Colchicine (COL) is an anti-inflammatory alkaloid extracted from the *Colchicum* plant (*Colchicum autumn crocus*) which inhibits the chemotactic activities of neutrophils by blocking the formation of microtubules. Forming tubulin-colchicine complexes by binding microtubules, inhibits microtubule polymerisation, leading to repress vesicle transport, cytokine secretion, phagocytosis, migration, and the cell division. The activity of colchicine differs at high and low dose concentrations; while it promotes microtubule dissociation at high doses; at low doses, suppresses microtubule growth. The inhibition mechanisms in neutrophils include inhibition of tyrosine kinases and phospholipases as molecules responsible for intracellular signalling, neutrophil chemotaxis, and lysosomal enzyme release

in phagocytosis. It is also reported that colchicine regulates neutrophil deformation and inhibits neutrophil superoxide anion production, NACHT-LRRPYD-containing protein 3 (NALP3) inflammasomes, IL1 β processing and release and increases leukocyte cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels. Additional effect of colchicine on the inflammatory-process-has been demonstrated-in recent studies is that mediating it reduces inflammation through the regulation of myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor (MICL), expressed by macrophages, monocytes, neutrophils, myeloid and plasmacytoid dendritic cells [48].

Colchicine can both decrease TNF- α receptor expression in macrophages by disrupting vesicular traffic and prevent granule release in mast cells by preventing degranulation. Proinflammatory cytokine levels of IL-1 β , IFN γ , IL-18 and IL-6 have been reported to decrease after colchicine use in *in vivo* and *in vitro* studies. Hence colchicine is included in the treatment procedures of many inflammatory conditions. [49].

However its limited efficacy, colchicine is used as the first choice in therapy regimens due to its low cost and safety profile [50]. Colchicine has been found to be particularly effective in the treatment of mild mucocutaneous lesions, and musculoskeletal disorders in BD [43]. Nevertheless, dose adjustment is required in cases where colchicine, a narrow-spectrum drug, has haematological side effects such as cytopenia [51].

Colchicine is often used in combination with other drugs during the attack. Data from studies on the combined use of colchicine and cyclosporine have proven that the frequency of eye attacks is reduced in BD. However, colchicine is not sufficient in the treatment of severe complications due to presence of T-cell abnormalities before neutrophil activation in the pathogenesis of the disease. Accordingly, other treatment agents such as cyclosporine A or anti-TNF- α have been used in the management of more severe involvements [4].

Apremilast

Apremilast, a phosphodiesterase (PDE)-4 inhibitor, has been approved for the treatment of oral ulcers in Behçet's disease, with efficacy demonstrated in phase 2 and phase 3 clinical trials. Studies have shown that patients taking apremilast have lower number of oral ulcers and less severity of pain and significantly better results in complete response rates, overall disease activity and quality of life compared to placebo [52, 53].

Phosphodiesterase enzymes are involved in the degradation of the second messenger molecules of 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) which is potent regulator of innate and adaptive immune cell functions. PDE-4, a member of PDE superfamily is expressed in various cells including proinflammatory cells. The inhibition of PDE-4 activity by Apremilast results in increased intracellular

cAMP levels, diminished proinflammatory mediators such as IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-17, and IL-23, but increased IL-10 levels [54] (See **Figure 1**).

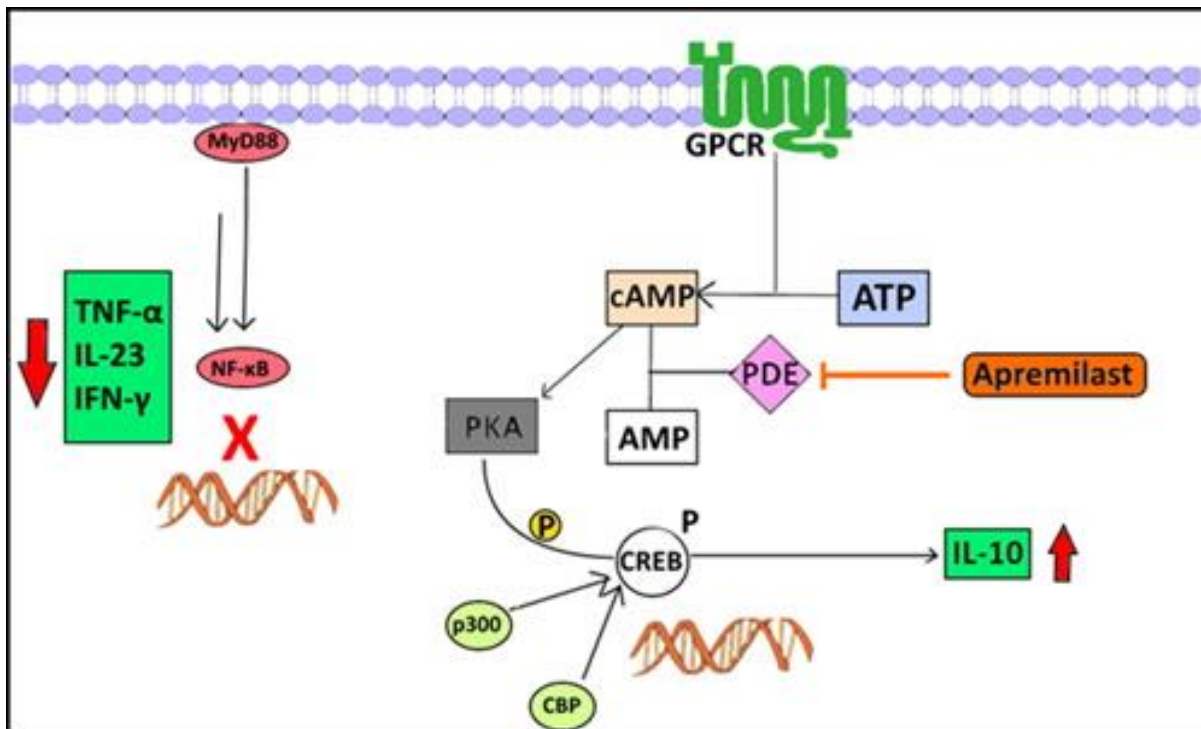


Figure 1. The mechanism of action of a Phosphodiesterase (PDE)- 4 inhibitor, Apremilast. It inhibits the expression of pro-inflammatory mediators by blocking PDE-4. High levels of cAMP modulate the anti-inflammatory effect through activation of protein kinase A (PKA), followed by phosphorylation of the cAMP-response element binding protein (CREB), and by anti-inflammatory cytokine release.

Additionally, the activated PKA suppresses the Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) transcriptional activity and NF- κ B dependent expression of pro-inflammatory mediators such as Interleukin (IL)- 23, Tumour Necrosis Factor (TNF)- α , and Interferon (IFN)- γ [54].

Azathioprine (AZA)

A synthetic purine analogue of azathioprine (AZA) is an anti-inflammatory drug that has an important role in the treatment of BD [4]. A double-blind placebo-controlled study indicated the incidence of new eye involvements, the frequency / severity of attacks, and less oral / genital ulcers and joint involvements decreased in patients with BD using AZA, when compared with placebo in patients also taking corticosteroids [43]. In addition, administration of AZA in the early stages of therapy has been shown to be better than placebo in preventing the development of deep vein thrombosis [50].

AZA is a prodrug which is converted to 6-mercaptopurine and methylnitroimidazole through non-enzymatically cleavage in the liver after oral ingestion. 6-mercaptopurine is then metabolized to its inactive and active derivatives through a series of further enzymatic pathways. Particularly, 6-thioguanine nucleotides, which are mainly toxic and effective metabolites, inhibit purine nucleotide synthesis and proliferation through de novo pathway. The effect of azathioprine on leukocyte proliferation is thought to be according to the mechanism described over 6-mercaptopurine; and AZA is thought to be responsible for the cytotoxic effects due to the presence of toxic thioguanine nucleotides in the DNA and RNA. The effects of azathioprine, a metabolite of 6-mercaptopurine and mercaptimidazole on lymphocyte functionality were also evaluated in mice, and the results reported that T cell proliferation, and the nuclear factor of activated T cells (NFAT) followed by activation of T cell receptor are decreased [55].

AZA can be used alone or in combination with other immunosuppressants in the management of posterior uveitis together with glucocorticoids. However, the combination with interferon- α causes severe leukopenia in patients; this treatment should be avoided.

However, the use of interferon- α and AZA combination should be avoided as it causes severe leukopenia in patients. During acute exacerbations of gastrointestinal involvements, disease-modifying agents, AZA or 5-aminosalicylic acid (5-ASA), should be used together with corticosteroids [56].

Cyclophosphamide (CP)

Cyclophosphamide (CP), a fast alkylating, immunosuppressive agent, inhibits DNA replication by binding alkyl radicals to neutrophils. Thus, DNA is not able to be completely separated and replicated during cell division, so cell death occurs. CP suppresses the activity of T-helper cell function and decreases proliferation of T and B cells [57]. As a result, autoreactive, and proliferative immune cell functions are reduced [58].

In a double-blind cross-sectional study, in the treatment of persistent eye involvement, patients using combination therapy with cyclophosphamide and corticosteroids had better results than those using corticosteroid alone [43]. According to The European League Against Rheumatism (EULAR), published in 2018, cyclophosphamide is recommended to be used in the treatment of life-threatening complications such as nervous system and vascular involvement in BD [59]. However, due to its severe toxicity, cyclophosphamide is recommended to use on other treatment-resistant and severe complications [60].

Calcineurin Inhibitors (Cyclosporine A and Tacrolimus (FK506))

Cyclosporine

Cyclosporine is a 11 amino acids cyclic polypeptide from the fungus *Tolypocladium inflatum Gams*. Calcineurin is an enzyme, one of the steps of the signalling cascade initiated by stimulation of the CD4 type T lymphocyte receptor with the Ca^{+2} dependent antigen. Cyclosporine exerts its immunosuppressive and secondary neuronal damage-inhibitory effect by selectively inhibiting this enzyme. Therefore, as a first stage, it is connected to cyclophilin which is the cytoplasmic receptor in the cell. Calcineurin is a dephosphatase enzyme that breaks phosphate groups from the factors called NFAT which are inactive in the cell cytoplasm and transported to the cell nucleus where its site of action. NFAT allows gene transcription by binding to the promoter region of the interleukin-2 gene in the nucleus, thereby producing IL-2. It blocks the pathway at calcineurin level and is therefore responsible for inhibiting IL-2 production. Cyclosporine is generally used for the treatment of many complications of BD, especially for persistent eye involvement [32].

Tacrolimus (FK506)

Tacrolimus, a calcineurin (CaN) enzyme inhibitor like cyclosporine, is a macrolide group antibiotic obtained from *Streptomyces tsukubaensis*. it selectively inhibits T cell lymphocytes. However, according to *in vitro* test results; tacrolimus 50- 100 times more effective than cyclosporine. Although the binding pocket of both drugs is the same, it forms a complex targets a different receptor, FK-binding protein 12 (FKBP-12), instead of cyclophilin. However, there are few controlled studies reporting a reduction in recurrence rate and inflammatory activity in patients with uveitis receiving tacrolimus [61].

Tacrolimus mainly targets T lymphocytes by inhibiting calcineurin- NFAT signalling pathway [19]. Calcineurin is a calcium and calmodulin dependent phosphatase activating T cells of immune system. Signalling through the T cell receptor triggers upregulation of the activity of calcineurin that dephosphorylates the cytoplasmic NFAT. Following dephosphorylation, NFAT is transported to the nuclear domain for transcription of the IL-2 gene. Tacrolimus can suppress this process by binding enzyme calcineurin. Thus, NFAT translocation to the nucleus is prevented, and the production of cytokine IL-2 which is necessary for T-cell activation, is blocked [55, 61] (See **Figure 2**).

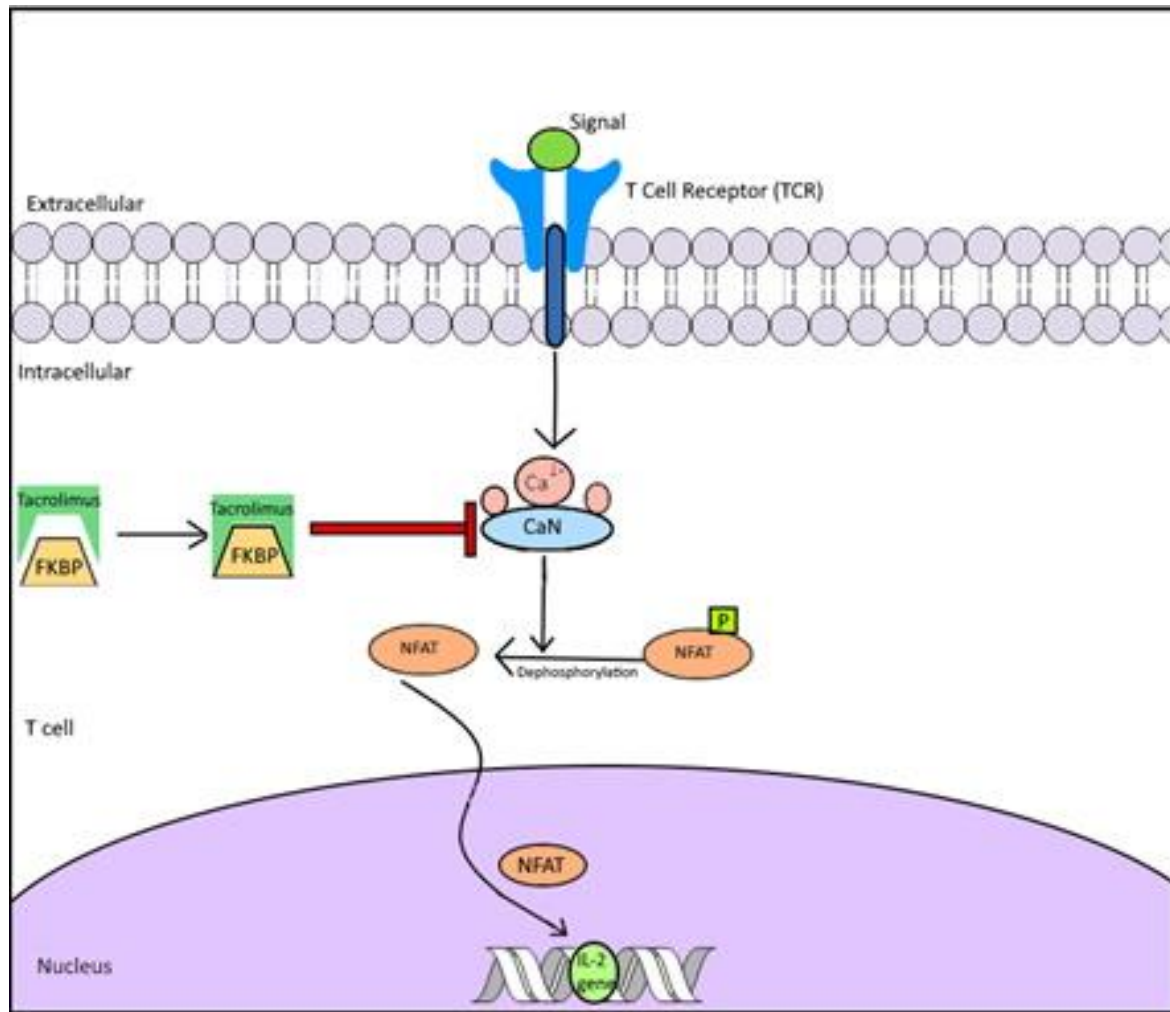


Figure 2. Mechanism of action of Tacrolimus. Upon entry into T cells, Tacrolimus forms a complex with the immunophilin FK506-binding protein (FKBP). This complex suppresses the dephosphorylation of the nuclear factor of activated T-cells (NFAT), consequently reducing the IL-2 transcription required for T cell activation [55].

Dapsone

Dapsone is characterized by both anti-infective and prominent anti-inflammatory properties [62]. It inhibits the increased chemotactic, lysosomal and myeloperoxidase activity of neutrophils. In addition, dapsone, which has an antioxidant activity, can be used as an alternative to colchicine [2, 63]. Neutrophil-induced destruction can be controlled by dapsone in inflammatory diseases.

While the use of dapsone is recommended for the treatment of moderate symptoms; it is not used in the management of the most severe mucocutaneous, ocular and systemic disorders. In a double blind, cross-comparative study of 20 patients, the frequency of oral and genital ulcer episodes,

papulopustular and erythema nodosum findings have been reported to decrease in dapsone users [59]. Other published studies support the effectiveness of dapsone [64].

Although the potency of dapsone in dermatological lesions is unknown; it is thought to have an effect on reducing the level of destruction by preventing neutrophil migration. It acts on neutrophil-induced skin lesions in patients by inhibiting the myeloperoxidase-peroxide halide mediated cytotoxic system. In lesions, dapsone reduces chemotactic lipid levels and controls LTB₄ (leukotriene B₄)-mediated neutrophil chemotaxis and neutrophil migration. It also reduces the neutrophil adhesions to IgA [65].

Methotrexate (MTX)

Methotrexate (MTX) shows its effect by decreasing the expression of cell adhesion molecules, decreasing endogenous adenosine release, and causing apoptosis in T cells by decreasing cell proliferation [60].

MTX has been reported to be effective in ocular, neurological and mucocutaneous involvements in recent studies [66].

The mechanism of action of MTX has varied according to many cellular mechanisms. Although this mechanism of MTX shows activity on both malignant and non-malignant cells, the anti-inflammatory activity of the drug should also be considered [67]. It affects the de novo synthesis of purine and pyrimidine bases by interfering tetrahydrofolate-dependent processes. As a result, diminished levels of methyl donors as tetrahydrofolate and methyltetrahydrofolate leads to inhibition of lymphotoxic polyamine generations. Inhibition of the enzyme aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (AICAR) transformylase results in elevated intracellular levels of AICAR, leading to inhibition of AMP deaminase and adenosine deaminase production in which catabolic processes of adenosine monophosphate (AMP) and adenosine to inosine monophosphate (IMP) and inosine. Thereby, gathered adenosine levels exerts anti-inflammatory effects [68].

Based on the various cell types, the efficacy of MTX is varies. In T cells, it acts by inhibiting the reduction of dihydrobiopterin (BH₂) to tetrahydrobiopterin (BH₄), which is catalysed by the enzyme dihydrofolate reductase (DHFR). The uncoupling of nitric oxide synthase (NOS), following increased levels of reactive oxygen species (ROS) promote the JUN N-terminal kinase (JNK), which leads to protein synthesis responsible for apoptosis and cell cycle processes. Methotrexate activates DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) in T cells by unclarified mechanisms, promoting the induction of LincRNA p21, long intergenic noncoding RNA p21 (lincRNA-p21), which inhibits translation of RELA mRNA. Thereby, it increases the proinflammatory transcription factor NF-κB levels and inhibits inflammatory response. Methotrexate also inhibits NF-κB activity in Fibroblast-like synoviocytes by mediating the inhibition of AICAR transformylase (ATIC), elevated adenosine secretion, and activation

of adenosine receptors, which results in inhibition of NF- κ B, and ultimately anti-inflammatory effects. In monocytes, inducing apoptosis and increasing the expression of proinflammatory cytokines by an unknown NF- κ B-dependent mechanism that has not yet been revealed is thought to be emerged through inhibition of DHFR-mediated reduction of dihydrofolate (DHF) to tetrahydrofolate (TTF) [67].

Treatment Methods Based on Immunopathogenesis in BD

Anti-Tumour Necrosis Factor- α (Anti-TNF- α)

TNF- α acts as the basic cytokine in the generation and maintenance of inflammatory response. Many studies confirm that TNF- α plays a critical role in the pathogenesis of BD. High levels of TNF- α production were detected in aqueous humor and serum of patients. During the active periods of the disease, an increase in the number of cells responsible for producing TNF- α ; and the presence of TNF- α was observed in experimental animal models with eye involvement [18].

In the pathogenesis, elevated TNF- α concentrations occur in the inflammation area. Removal of excess TNF- α from these regions has become a target in the treatment. Therefore, agents that may be effective in treatment have designed to reduce the effect of TNF- α . These three anti-TNF- α agents, infliximab, etanercept, and adalimumab, have been investigated in the treatment of ocular disorders [43]. Almost all symptoms have been suppressed by a rapid and apparent response in the treatment with anti-TNF- α of BD. Promising results have been obtained in severe complications, particularly in the presence of persistent mucocutaneous lesions, ocular involvement, gastrointestinal symptoms, arthritis, and cerebral vasculitis. In addition, these drug groups reduce the dose of other immunosuppressants to be used in combined therapy. Anti-TNF- α agents in the patient groups with severe complications of BD-resistant to standard immunosuppressive therapies provide significant therapeutic benefit. However, the route of administration of these drug groups, their costly and toxic side effects and the lack of long-term therapeutic efficacy limit the widespread use of the drug. Based on case reports, it can be suggested that TNF blockade gives good results in individuals with BD who are resistant to or intolerant to severe and standard immunosuppressant therapies [69].

Infliximab

The two known TNF receptors are TNFr1 that binds soluble TNF, and TNFr2 that binds membrane-bound TNF. Infliximab, a chimeric monoclonal antibody, acts by inhibiting the binding of TNF to these two receptors. It reduces the frequency of uveitis attacks. In addition, it has also been reported to be effective in genital ulcers, erythema nodosum, and other skin lesions. According to the data, there is a significant recovery in visual activity and decrease ocular and inflammation within 24 hours after the administration of Infliximab [69].

Data on the effect of the drug on vascular disorders are limited but positive results have been reported [63]. Infliximab is widely used in the treatment of neurological, gastrointestinal and mucocutaneous disorders resistant to conventional treatment in BD [70].

Positive results have been obtained with infliximab in persistent macular oedema and improvement of visual activity, especially in the cases resistant to the combination of azathioprine, cyclosporine and corticosteroids [71]. However, TNF inhibitors are not sufficient to suppress the symptoms of BD alone, but it has been reported that good results can be obtained in long term combined therapies [69].

Etanercept (ETN)

Etanercept (ETN) is an anti-TNF- α agent and differs structurally from its monoclonal antibody constructs of adalimumab and infliximab [63]. ETN is a recombinant human IgG1 TNF-receptor-fusion protein that binds TNF and blocks interactions with its receptor, thus reducing TNF-mediated inflammatory events [72].

ETN is effective in the treatment of mucosal and skin lesions due to BD. In a randomized, double-blind controlled study, it was demonstrated reduced mucocutaneous manifestations in patients with BD treated with etanercept compared to placebo. There are limited reports on the use of ETN in ocular disorders. In addition, good results have been obtained in the treatment of central nervous system disorders of BD [45, 63].

Adalimumab (ADA)

A recombinant, fully humanized monoclonal antibody adalimumab (ADA) acts by binding to human TNF- α and blocking its interaction with the surface cell receptors p55 and p75, thereby preventing the induction of cytokine-induced inflammatory pathways [73].

After approval by European and US authorities for the treatment of ocular inflammatory disorders, ADA will likely be the first-line choice in the treatment of anti-TNF agents in patients with BD-related uveitis. Although there are promising case reports of the use of ADA in refractory intestinal BD, data from controlled clinical studies are lacking. Additionally, good results were obtained from the studies by using adalimumab in patients with BD in central nervous system (CNS) and vascular involvements [74].

Interferon Alpha (IFN- α)

Interferon alpha (IFN- α) is one of the immunomodulatory cytokines found naturally in the body. Interferons are a family of glycoproteins with antiviral, antitumor and immunomodulatory activities [45].

In the treatment, IFN- α was first used because of its antiviral effects against Herpes simplex virus type-1. The biological effects of IFN- α are the activation of NK cells, inhibition of gamma delta

($\gamma\delta$) T cells, increased expression of HLA-1 from peripheral monocytes, and reduction of T cell adhesion to endothelial cells. Controlled studies published in recent years suggest that IFN- α may be an effective alternative for BD-related mucocutaneous lesions, eye, and joint involvements. Besides, it decreases the frequency of papulopustular lesions, and genital ulcers, and the rate of recurrent attacks of eye diseases. However, all symptoms tend to return to their pre-treatment levels at the end of the treatment [75].

Rituximab (RTX)

Rituximab (RTX), a chimeric murine/ human IgG1k monoclonal antibody, is directly targeted to CD20 surface antigen which is a B cell differentiating marker and regulator of the cell division cycle [63]. By binding, RTX causes B lymphocyte depletion through complement dependent cytotoxicity (CDC) and antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) [76].

There are case studies investigating the effectiveness of RTX on BD-related manifestations. According to one case report, rituximab has been reported to be effective in remission of the treatment of retinal vasculitis resistant to glucocorticoids, azathioprine and ETA [44, 63]. In addition, a single blind pilot study on the use of RTX in ocular lesions of BD has been published. In this study, 20 patients received RTX or cyclophosphamide. The results show that after administration of methotrexate and prednisolone, patients receiving RTX significantly reduced intraocular inflammation over a 6-month period. [77].

Alemtuzumab (ALZ, Campath 1-H)

Alemtuzumab (ALZ) is a 1-H humanized monoclonal antibody that directly targets CD-52, a surface antigen found on lymphocytes and macrophages [77]. However, the activity of CD52 is not fully known, recently it has been reported that it may be a regulatory function of activated CD4 T cells that express high levels of CD52[78]. After infusion ALZ mainly causes profound CD52 + cell depletion through ADCC and complement-dependent cytotoxicity (CDC), the recovery time is long and often incomplete [79].

ALZ, which is used in the treatment of many and autoimmune diseases and haematological malignancies, as used after transplantation, will be an effective alternative in the treatment of persistent BD cases [80]. In a 20-year experience study of the use of ALZ in patients with severe BD and refractory to at least one treatment agent. ALZ was used in patients with ocular, central nervous system (CNS), gastrointestinal (GI), and vascular symptoms of BD [77].

Daclizumab (DAZ)

Daclizumab (DAZ), a humanized anti-IL-2R α (anti-CD25) monoclonal antibody, acts by blocking the activated lymphoid cells IL-2-mediated responses by binding to the CD25 subunit of the high affinity IL-2 receptor [33]. Since IL-2 is the mediator that stimulates and regulates the immune system, success in therapy was aimed by targeting CD25 [81].

Although DAZ was withdrawn from the market after the approval for use in organ transplantation in Europe, there are continuing clinical studies on the safety and efficacy of DAZ in inflammatory bowel disease, uveitis and multiple sclerosis [77].

Tocilizumab

Tocilizumab, a humanized anti-Interleukin -6 (anti-IL-6) receptor antibody, acts by binding to soluble or membrane-bound IL-6 receptors and inhibiting IL-6 signalling competitively [77].

IL-6 is one of the regulators of immune response and inflammatory reactions [82], which also has a critical role in Neuro-Behçet's Disease (Neuro-BD). Therefore, IL-6 signalling inhibited by Tocilizumab reveals a new treatment regimen in Neuro-BD. Several case reports have been published regarding the evaluation of the efficacy of tocilizumab on patients with Neuro-BD [83]. Information from these cases supports the promising results of tocilizumab [84]. Another study investigating the efficacy of the drug on refractory uveitis of BD obtained good responses, suggesting that tocilizumab may be a therapeutic option in the treatment of this manifestation [77, 85].

A small retrospective study of tocilizumab in the treatment of refractory vasculo-Behçet's syndrome between the years 2014 and 2018 was reported [86]. In this study, tocilizumab was added to existing corticosteroid and immunosuppressive treatments of patients suffering from the vascular manifestations. Data conducted from the study suggest that tocilizumab may be effective in combined therapy in the management of refractory vasculo-Behçet's syndrome [77, 87].

Secukinumab (SCM)

Secukinumab (SCM) is a fully human monoclonal antibody, selectively inhibits the IL17A [88, 89]. IL-17A, one of the main proinflammatory cytokines, is particularly produced by Th17 cells and expressed by NK cells, mast cells, and neutrophils [88]. SCM binds directly to IL-17A, blocking its interaction with the receptor, thereby suppressing the downstream inflammatory pathway responsible for the prognosis of the disease [90].

After the approval of SCM use in the treatment of psoriasis, psoriatic arthritis and ankylosing spondylitis in the USA, this agent was also evaluated for its effectiveness on BD-related mucocutaneous and articular symptoms. Although the obtained data are promising, there is a need for more adequately

controlled studies on this topic [87]. Additionally, different randomized, placebo-controlled, double-blind clinical studies have been conducted to investigate the effect of SCM on non-infectious uveitis. In one study, it was found that there was no significantly different remission rate between the treatment and placebo groups, resulting with early termination of other studies [77].

Anakinra (ANR)

The recombinant, non-glycosylated human IL-1 receptor blocker Anakinra (ANR) competes with both IL-1 α and IL-1 β cytokines by binding to IL-1 receptor-1 (IL-1R1). After IL-1 binds to IL-1R1 and forms a receptor-ligand complex; and stimulates IL-1 accessory protein (IL-1AcP). ANR binds to IL-1R1 instead of IL-1, inhibiting the signalling pathway that induces secondary inflammatory mediators such as prostaglandins, cytokines, and chemokines [91].

After ANR has been approved in the treatment of rheumatoid arthritis, there are studies that the off-label use of ANR have an effect on inflammatory conditions [92]. There were case series reporting the effectiveness of ANR in remission of refractory uveitis [93]. Another a pilot open label study of ANR efficacy on refractory oral and genital ulcers. According to the study, in addition to the disappearance of ulcer symptoms in two patients, it was reported that the remaining five patients had signs of partial healing [77].

Gevokizumab

IL-1 is an inflammatory cytokine that has a crucial role in regulating the innate immune response. Gevokizumab, IgG₂ recombinant humanized allosteric monoclonal antibody responsible for IL-1 β inhibition; acts by suppressing the bioactivation of IL-1 β through its receptor signalling complex [94].

In the first study that tested the efficacy and safety of gevokizumab in patients with treatment-resistant uveitis in BD, it was reported that recurrence of uveitis decreased despite discontinuation of immunosuppressive therapies [95]. Another study was the phase 2 study to evaluate the pharmacokinetic and pharmacodynamic profile as well as clinical and biologic activity of gevokizumab in patients suffered from uveitis [96]. Although the study was terminated because the desired endpoints were not achieved, positive results have been obtained in treatment with gevokizumab [77, 95].

Canakinumab (CAM)

Canakinumab (CAM) is human anti-IL-1 β monoclonal antibody. IL-1 β is one of the major cytokines involved in many inflammatory diseases, has become the target during the development of the new anti-inflammatory agent [97]. To suppress inflammation, it binds to IL-1 and block interaction with its receptor, thereby inhibiting the signalling pathway [94].

There are published case reports of CAM efficacy on TNF- α inhibitors resistant to BD, pediatric BD, and severe and refractory BD with major vascular, ocular, and gastrointestinal symptoms [98]. In order to analyse the effectiveness of CAM in three retrospective cohort studies; patients suffering from refractory BD were given either ANR or CAM. Based on the suggested results by the authors, reduced ocular symptoms occurred with the use of CAM [99].

Golimumab (GLM)

Golimumab (GLM), a new fully humanized anti-TNF- α monoclonal antibody, blocks endogenous TNF- α activity by binding soluble and transmembrane TNF- α and disrupting binding to the TNF- α receptor [100]. Thus, the formed Ab-TNF- α complex inhibits the interaction with the receptor that promotes myriad inflammation cascades [101].

The higher affinity and avidity of GLM for TNF- α than other available anti-TNF- α agents has been reported [100]. Recently, in studies of Golimumab promising results have been showed regarding the effectiveness of non-infectious uveitis and Uveitis of Behçet' s Disease [102, 103].

Certolizumab pegol (CZP)

Certolizumab (CZP) is a humanized recombinant Fab' fragment, which specifically targets human TNF- α and able to neutralize both soluble and membrane-bound forms [104, 105]. Polyethylene glycol (PEG) was attached to its molecular structure in order to improve its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. In addition, since CZP lacks an Fc region in the Fab fragment, Fc-induced effects such as complement fixation and cell lysis are not observed [106]. Another difference between certolizumab and other TNF- α inhibitors (adalimumab, etanercept, and infliximab) is that while certolizumab is bivalent, these agents are univalent [104].

However, in reports that include limited numbers of patients, recent studies have reported that CZP is effective for ocular and other refractory manifestations of Behçet' s disease [77, 102, 107].

Ustekinumab

IL-12 and IL-23 cytokines play an important role in the differentiation and activation of Th17 and Th1 lymphocytes and NK cells, which are involved in the pathogenesis of BD. Ustekinumab, a humanized immunoglobulin G_K (IgG_K) monoclonal antibody, directly targets to those, which regulate inflammatory and immune responses. It binds to the p40 subunits of IL-12 and IL-23, inhibiting their binding to these receptors on the surface of T cells, NK cells and antigen presenting cells [108].

According to the recent studies, the use of ustekinumab for BD patients with colchicine-resistant oral ulcers has shown promising efficacy [109]. The effectiveness of Ustekinumab in the

treatment of BD-like diseases such as psoriasis and Crohn's disease which share Th17 pathway has also been reported [110].

Specific Immune Tolerance Induction

HSPs play a major role in the pathogenesis of BD are synthesized when stimulated by a nonspecific stimulant such as cell, trauma, heat, and infection. Tolerance Induction is the method used in the treatment of autoimmune uveitis in BD [63, 111]. It has been reported that 336-351 peptide, which is subcutaneously administered to HSP-60, reduce the severity and development of uveitis seen in BD, and 336-365 peptide covalently linked to the orally administered recombinant cholera toxin B (CTB) subunit. Moreover, no adverse effects during treatment suggests that tolerization therapy may be one of the effective alternatives in the management of BD [18, 112].

Immunoablation

Autologous hematopoietic cell transplantation and immunoablation have been shown to be effective in the treatment of autoimmune disorders. Myeloablative chemotherapy followed by immunosuppressive drugs and T cell free hematopoietic stem cell transplantation were found to be effective and safe in BD. Especially in cases with resistance to immunosuppressive therapies, immunoablation may be an alternative treatment method in the control of BD [18].

Other drugs

Rebamipide

Rebamipide, a gastroprotective agent, provides inhibition of free radicals and inflammatory cytokines from activated neutrophils. It protects existing cells and shows its efficacy by regenerating the lost tissue [113].

The mucoprotective effects of rebamipide on gastric ulcer lesions are mediated by elevated prostaglandin levels in the gastric mucosal surface by promoting upregulation of cyclo-oxygenase-2 (COX-2) protein, endothelial growth factor (EGF) and EGF receptors. EGF and prostaglandin E2 (PGE2) are normally found in biological secretions, responsible for the healing of impaired mucosal lesions and maintenance of the protective barrier in the epithelium. Rebamipide also regulates the mucus secretion, neutrophil inactivation, and free radical elimination as well as effects on COX-2 and EGF [114].

In a double-blind placebo-controlled clinical study on patients with oral ulceration due to BD; patients after underwent rebamipide for 3-6 months, moderate/ significant improvement in oral ulcers has been reported. Therefore, rebamipide is thought to be effective in the prevention and treatment of attacks in oral ulcers [113].

Mycophenolate Mofetil (MMF)

Mycophenolic acid (MPA) was first identified with its antibiotic effects after being isolated from *Penicillium stoloniferum* cultures in 1913 [115]. Antibacterial, antifungal, antitumoral, antiviral and anti-inflammatory effects of the compound were described in following decades [116, 117]. After the anti-inflammatory activity of MPA gained interest, the ester form Mycophenolate Mofetil (MMF) was developed due to its improved bioavailability and gastrointestinal (GI) tolerability [117, 118].

MMF is a selective and non-competitive inhibitor of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH), an enzyme involved in de novo pathway of purine nucleobases. Generally, many cells in the organism are able to synthesize guanine nucleotides through two different pathways, namely de novo and salvage pathways. However, lymphocytes mainly perform their guanine nucleotide synthesis processes through the de novo pathway, so MPA specifically targets T and B lymphocytes, preventing their proliferation [119]. MMF also disrupts the endothelial cell adhesions and lymphocyte and monocyte recruitment to sites of inflammation [55, 120].

B and T lymphocytes specific inhibitor MMF is generally applied in post-transplant therapies. There is a published clinical study of 4 cases with parenchymal neuro-BD, where used immunosuppressive treatment could not be continued due to intolerance or inefficacy. According to study, it has been reported that these patients have positive results with MMF and remission has proceeded for 3–7-years [121]. In another clinical study, MMF has been administered in combination with prednisolone, but no positive results have been obtained compared with placebo. However, the use of immunosuppressive agents in other autoimmune diseases suggests that it may also be effective in BD [55].

Levamisole

Levamisole, an anthelmintic agent, is also used in the treatment of BD. The mechanism of action of levamisole is not fully known. It is thought that it plays a role in cellular immunity by affecting the T cells in various circles [122].

The anthelmintic effect of levamisole occurs as an agonist of nicotinic acetylcholine receptor. The immunomodulatory properties varied and primarily effects on macrophages and T-lymphocytes. Privilege effect of levamisole on T helper-1 cells following the upregulation of IL-2, IL -12 and IFN- γ was demonstrated. According to the data obtained, inhibition of endogenous immunosuppressive factors and increased B-cell activity indicate low levels of immunoglobulin G, immunoglobulin M and circulating immune complexes. The drug has anti-nergic properties that regenerate depressed immune responses in immunocompetent individuals [123].

According to previous clinical studies, levamisole has been reported to be effective on patients with oral and genital ulcers, arthritis, and uveitis [60].

Sulfasalazine

Sulfasalazine has several effects such as anti-inflammatory, antiproliferative as well as its antibacterial potency. It exerts anti-inflammatory and immunosuppressive effect by inhibiting cytokine release, and leukotriene synthesis and NF- κ B transcription. It eliminates T-cell cytokine IL-2 and monocyte macrophage cytokines (IL-1, IL-6, IL-12, and TNF), reduces leukotriene production, and disrupts cell adhesion and function. Sulfasalazine acts by inhibiting endothelial cell chemotaxis and migration of inflammatory cells as neutrophils and reducing superoxide and proteolytic enzyme synthesis. Other considerable in vitro anti-inflammatory effects of sulfasalazine are inhibition of PGE2 synthase enzyme activity, apoptosis of neutrophils, inhibition of the extracellular release of proinflammatory secretory phospholipase A2 and B-cell suppression and immunoglobulin production. It has been reported to be effective in relieving BD-related gastrointestinal symptoms [124].

Zinc Sulphate

There are studies suggesting that oral zinc sulphate is effective in preventing clinical symptoms with no side effects related to BD [125].

The antioxidant effect of zinc sulphate has a therapeutic effect on BD. Increased zinc levels in serum mediate increased antioxidant effects in BD patients suffering from the detrimental effect of reactive oxygen species leading to immunological events of BD. Further mechanism should be considered is that zinc has an immunomodulatory effect on BD of autoimmune origin that might be useful in the treatment of BD [125].

Pentoxifylline

Pentoxifylline is another agent with anti-TNF activity. The major pharmacological effect of pentoxifylline is the inhibition of several proinflammatory cytokines, particularly TNF- α . CD8 + type T lymphocytes are likely to have a suppressive effect directly on the inhibition of perforin. Furthermore, it reduces the production of free radicals and neutrophil-induced tissue damage [80].

Although a clinical study on pentoxifylline has not been published, anecdotal data suggest that it may be useful in the treatment of oral and genital ulcers in BD [126].

Benzathine Penicillin

According to one study, the use of benzathine penicillin with colchicine was found to be more effective than colchicine alone. It has been reported that this combination reduces the frequency, duration, and prolongation of remission in oral ulcers, genital ulcers, and erythema nodosum attacks in BD [127].

Surgical Treatments

Although there are many medical treatment methods, surgical interventions are performed especially in arterial aneurysms. Surgical treatment may be necessary in patients with recurrent or severe haemoptysis. Endovascular treatment of pseudoaneurysms associated with BD can be an effective option when symptoms are controlled by immunotherapy. Surgical procedures may be the only possible treatment in other serious conditions, such as in gastrointestinal canal perforations, enterocutaneous fistula formation, thrombotic obstructions in large vessels, cardiac involvements, eye complications (such as glaucoma), and vitreous opacities [128].

RESULT AND DISCUSSION

BD is an inflammatory disease with local and systemic involvements. The treatment strategies of these involvement vary from local corticosteroids to antibodies, determined by type and severity of symptoms. In addition, there are controlled studies based on the treatment of vascular, neurological, and gastrointestinal disorders. Colchicine is the primary care agent for the mucocutaneous involvements, as well as apremilast has been shown to be safe in the oral ulcerations. In some persistent manifestations, anti-TNF- α agents may be effective, with the development of biotechnological drugs, positive results have been obtained. But for some; require new treatment strategies. Future research should focus on the study on combined use of immunosuppressive drugs with anti-TNF antibodies, the use and the effectiveness of anticoagulant agents in the treatment of venous thrombosis, and the immunosuppressive treatment in early use in patients who were thought to have high risk in major organ involvements. Additionally, advances in molecular genetics and potentially newly discovered inflammatory pathways (e.g., those related to HLA - B * 51), will have a great impact on us in designing newer and more effective compounds in the management Behçet' s Disease.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: A.Ö.Ş., G.Y.Ç.; Design: G.Y.Ç.; Control: A.Ö.Ş.; Sources: G.Y.Ç. Materials: G.Y.Ç.; Data Collection and/ or Processing: G.Y.Ç.; Analysis and/ or Interpretation: A.Ö.Ş.; Literature Review: G.Y.Ç.; Manuscript Writing: G.Y.Ç.; Critical Review: G.Y.Ç., A.Ö.Ş.; Other: G.Y.Ç., A.Ö.Ş.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

1. Greco, A., De Virgilio, A., Ralli, M., Ciofalo, A., Mancini, P., Attanasio, G., de Vincentiis, M., Lambiase, A. (2018). Behçet's disease: new insights into pathophysiology, clinical features and treatment options. *Autoimmunity Reviews*, 17(6), 567-575. [CrossRef]
2. Marshall, S.E. (2004). Behçet's disease. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 18(3), 291-311. [CrossRef]
3. Bulur, I., Onder, M. (2017). Behçet disease: new aspects. *Clinics in Dermatology*, 35(5), 421-434. [CrossRef]
4. Yurdakul, S., Mat, C., Tüzün, Y., Özyazgan, Y., Hamuryudan, V., Uysal, Ö., Şenocak, M., Yazici, H. (2001). A double-blind trial of colchicine in Behçet's syndrome. *Arthritis Rheumatism*, 44(11), 2686-2692. [CrossRef]
5. Sakane, T., Takeno, M., Suzuki, N., Inaba, G. (1999). Behçet's disease. *New England Journal of Medicine*, 341(17), 1284-1291. [CrossRef]
6. Ellison L.S., Yazici, Y. (2021). Treatment of Behçet syndrome. *Uptodate*, from <https://www.uptodate.com/contents/treatment-of-behçet-syndrome> Retrieved March 09, 2022. [CrossRef]
7. Fani, M., Ebrahimi, H., Pourshahidi, S., Aflaki, E., Sarvestani, S.S. (2012). Comparing the effect of phenytoin syrup and triamcinolone acetonide ointment on aphthous ulcers in patients with Behçet's syndrome. *The Iranian Red Crescent Medical Journal (IRCMJ)*14(2), 75. [CrossRef]
8. Alpsoy, E., Er, H., Durusoy, C., Yilmaz, E. (1999). The use of sucalfate suspension in the treatment of oral and genital ulceration of Behçet disease: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Archives of Dermatology*, 135(5), 529-532. [CrossRef]
9. Melikoglu, M., Fresko, I., Mat, C., Ozyazgan, Y., Gogus, F., Yurdakul, S., Hamuryudan, V., Yazici, H. (2005). Short-term trial of etanercept in Behçet's disease: a double blind, placebo controlled study. *The Journal of Rheumatology*, 32(1), 98-105. [CrossRef]
10. Arida, A., Fragiadaki, K., Giavri, E., Sfikakis, P. P. (2011). Anti-TNF agents for Behçet's disease: analysis of published data on 369 patients. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 41(1), 61-70. [CrossRef]
11. Vallet, H., Riviere, S., Sanna, A., Deroux, A., Moulis, G., Addimanda, O., Salvarani, C., Lambert, M., Bielefeld, P., Seve, P. (2015). Efficacy of anti-TNF alpha in severe and/or refractory Behçet's disease: multicenter study of 124 patients. *Journal of Autoimmunity*, 62, 67-74. [CrossRef]
12. Masuda, K., Urayama, A., Kogure, M., Nakajima, A., Nakae, K., Inaba, G. (1989). Double-masked trial of cyclosporin versus colchicine and long-term open study of cyclosporin in Behçet's disease. *The Lancet*, 333(8647), 1093-1096. [CrossRef]

13. Alpsoy, E., Durusoy, C., Yilmaz, E., Ozgurel, Y., Ermis, O., Yazar, S., Basaran, E. (2002). Interferon alfa-2a in the treatment of Behçet disease: a randomized placebo-controlled and double-blind study. *Archives of Dermatology*, 138(4), 467-471. [\[CrossRef\]](#)
14. Ehrlich, G.E. (1998). Behcet disease and the emergence of thalidomide. *Annals of Internal Medicine*, 128(6), 494-495. [\[CrossRef\]](#)
15. Hatemi, G., Silman, A., Bang, D., Bodaghi, B., Chamberlain, A., Gul, A., Houman, M., Kötter, I., Olivieri, I., Salvarani, C. (2008). EULAR recommendations for the management of Behçet disease. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 67(12), 1656-1662. [\[CrossRef\]](#)
16. Yazici, H., Pazarli, H., Barnes, C.G., Tüzün, Y., Özyazgan, Y., Silman, A., Serdaroğlu, S., Oğuz, V., Yurdakul, S., Lovatt, G.E. (1990). A controlled trial of azathioprine in Behcet's syndrome. *New England Journal of Medicine*, 322(5), 281-285. [\[CrossRef\]](#)
17. Hamuryudan, V., Özyazgan, Y., Hizli, N., Mat, C., Yurdakul, S., Tüzün, Y., Şlenocak, M., Yazici, H. (1997). Azathioprine in Behçet's syndrome. Effects on long-term prognosis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 40(4), 769-774. [\[CrossRef\]](#)
18. Pipitone, N., Olivieri, I., Cantini, F., Triolo, G., Salvarani, C. (2006). New approaches in the treatment of Adamantiades-Behçet's disease. *Current Opinion in Rheumatology*, 18(1), 3-9. [\[CrossRef\]](#)
19. Barnes, C.G. (2006). Treatment of Behcet's syndrome. *Rheumatology*, 45(3), 245-247. [\[CrossRef\]](#)
20. Reed, J.B., Morse, L.S., Schwab, I.R. (1998). High-dose intravenous pulse methylprednisolone hemisuccinate in acute Behcet retinitis. *American Journal of Ophthalmology*, 125(3), 409-411. [\[CrossRef\]](#)
21. Mohammadi, M., Shahram, F., Shams, H., Akhlaghi, M., Ashofteh, F., Davatchi, F. (2017). High-dose intravenous steroid pulse therapy in ocular involvement of Behcet's disease: a pilot double-blind controlled study. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 20(9), 1269-1276. [\[CrossRef\]](#)
22. Tuncer, S., Yilmaz, S., Urgancioglu, M., Tugal-Tutkun, I. (2007). Results of intravitreal triamcinolone acetonide (IVTA) injection for the treatment of panuveitis attacks in patients with Behçet disease. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 23(4), 395-401. [\[CrossRef\]](#)
23. Yamada, Y., Sugita, S., Tanaka, H., Kamoi, K., Kawaguchi, T., Mochizuki, M. (2010). Comparison of infliximab versus ciclosporin during the initial 6-month treatment period in Behçet disease. *British Journal of Ophthalmology*, 94(3), 284-288. [\[CrossRef\]](#)
24. Tabbara, K.F., Al-Hemidan, A.I. (2008). Infliximab effects compared to conventional therapy in the management of retinal vasculitis in Behçet disease. *American Journal of Ophthalmology*, 146(6), 845-850. e841. [\[CrossRef\]](#)
25. Levy-Clarke, G., Jabs, D.A., Read, R.W., Rosenbaum, J.T., Vitale, A., Van Gelder, R.N. (2014). Expert panel recommendations for the use of anti-tumor necrosis factor biologic agents in patients with ocular inflammatory disorders. *Ophthalmology*, 121(3), 785-796. e783. [\[CrossRef\]](#)

26. Sajjadi, H., Soheilian, M., Ahmadi, H., Hassanein, K., Parvin, M., Azarmina, M., Ehyae, V., Amiransari, B. (1994). Low dose cyclosporin-A therapy in Behcet's disease. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 10(3), 553-560. [\[CrossRef\]](#)
27. Ozyazgan, Y., Yurdakul, S., Yazici, H., Tüzün, B., İşçimen, A., Tüzün, Y., Aktunc, T., Pazarli, H., Hamuryudan, V., Müftüoğlu, A. (1992). Low dose cyclosporin A versus pulsed cyclophosphamide in Behçet's syndrome: a single masked trial. *British Journal of Ophthalmology*, 76(4), 241-243. [\[CrossRef\]](#)
28. Atmaca, L. S., Batioglu, F. (1994). The efficacy of cyclosporin-A in the treatment of Behçet's disease. *Ophthalmic Surgery* 25(5), 321-7. [\[CrossRef\]](#)
29. Whitcup, S.M., Salvo Jr, E.C., Nussenblatt, R.B. (1994). Combined cyclosporine and corticosteroid therapy for sight-threatening uveitis in Behcet's disease. *American Journal of Ophthalmology*, 118(1), 39-45. [\[CrossRef\]](#)
30. BenEzra, D., Cohen, E., Chajek, T., Friedman, G., Pizanti, S., de Courten, C., Harris, W. (1988). Evaluation of conventional therapy versus cyclosporine A in Behçet's syndrome. *Transplantation Proceedings*, 20(3, Suppl 4), 136-143. [\[CrossRef\]](#)
31. Saenz, A., Ausejo, M., Shea, B., Wells, G.A., Welch, V., Tugwell, P. (1998). Pharmacotherapy for Behcet's syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2, from <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD001084/full> Retrieved April 27, 2022. [\[CrossRef\]](#)
32. Hamuryudan, V., Ozyazgan, Y., Fresko, Y., Mat, C., Yurdakul, S., Yazici, H. (2002). Interferon alfa combined with azathioprine for the uveitis of Behcet's disease: an open study. *The Israel Medical Association Journal (IMAJ)*, 4(Suppl. 11), 928-930. [\[CrossRef\]](#)
33. Deuter, C.M., Kötter, I., Günaydin, I., Stübiger, N., Doycheva, D.G., Zierhut, M. (2009). Efficacy and tolerability of interferon alpha treatment in patients with chronic cystoid macular oedema due to non-infectious uveitis. *British Journal of Ophthalmology*, 93(7), 906-913. [\[CrossRef\]](#)
34. Kötter, I., Günaydin, I., Zierhut, M., Stübiger, N. (2004). The use of interferon α in Behçet disease: review of the literature. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 33(5), 320-335.. [\[CrossRef\]](#)
35. Kötter, I., Zierhut, M., Eckstein, A., Vonthein, R., Ness, T., Günaydin, I., Grimbacher, B., Blaschke, S., Meyer-Riemann, W., Peter, H. (2003). Human recombinant interferon alfa-2a for the treatment of Behcet's disease with sight threatening posterior or panuveitis. *British Journal of Ophthalmology*, 87(4), 423-431. [\[CrossRef\]](#)
36. Onal, S., Kazokoglu, H., Koc, A., Akman, M., Bavbek, T., Direskeneli, H., Yavuz, S. (2011). Long-term efficacy and safety of low-dose and dose-escalating interferon alfa-2a therapy in refractory Behçet uveitis. *Archives of Ophthalmology*, 129(3), 288-294. [\[CrossRef\]](#)
37. Sobacı, G., Erdem, Ü., Durukan, A.H., Erdurman, C., Bayer, A., Köksal, S., Karagul, S., Bayraktar, M. Z. (2010). Safety and effectiveness of interferon alpha-2a in treatment of patients with Behçet's uveitis refractory to conventional treatments. *Ophthalmology*, 117(7), 1430-1435. [\[CrossRef\]](#)
38. Davatchi, F., Shams, H., Rezaipoor, M., Sadeghi-Abdollahi, B., Shahram, F., Nadji, A., Chams-Davatchi, C., Akhlaghi, M., Faezi, T., Naderi, N. (2010). Rituximab in intractable ocular lesions

- of Behçet's disease; randomized single-blind control study (pilot study). *International journal of rheumatic diseases*, 13(3), 246-252. [\[CrossRef\]](#)
39. Coşkun, E., Celemler, P., Kimyon, G., Öner, V., Kisacik, B., Erbagci, I., Onat, A.M. (2015). Intravitreal dexamethasone implant for treatment of refractory Behçet posterior uveitis: one-year follow-up results. *Ocular Immunology and Inflammation*, 23(6), 437-443. [\[CrossRef\]](#)
 40. Fabiani, C., Emmi, G., Lopalco, G., Vannozzi, L., Bacherini, D., Guerriero, S., Franceschini, R., Frediani, B., Iannone, F., Tosi, M. (2017). Intravitreal Dexamethasone Implant as an Adjunct Weapon for Severe and Refractory Uveitis in Behçet's Disease. *The Israel Medical Association Journal: IMAJ*, 19(7), 415-419. [\[CrossRef\]](#)
 41. Yalcinbayir, O., Caliskan, E., Gunduz, G.U., Gelisken, O., Kaderli, B., Yucel, A.A. (2019). Efficacy of dexamethasone implants in uveitic macular edema in Cases with Behçet Disease. *Ophthalmologica*, 241(4), 190-194. [\[CrossRef\]](#)
 42. Ward, E.M., Woodward, T.A., Mazlumzadeh, M., Calamia, K.T. (2004). Gastrointestinal disease in Behçet's disease. In: C. Zouboulis, (Ed.), *Adamantiades -Behçet's Disease*, (pp. 459-464). Boston, MA: Springer. [\[CrossRef\]](#)
 43. Esatoglu, S.N., Hatemi, G. (2019). Update on the treatment of Behçet's syndrome. *Internal Emergency Medicine*, 14(5), 661-675. [\[CrossRef\]](#)
 44. Alpsoy, E. (2012). New evidence-based treatment approach in Behçet's disease. *Pathology Research International*, 2012, 1-11. [\[CrossRef\]](#)
 45. Mendes, D., Correia, M., Barbedo, M., Vaio, T., Mota, M., Gonçalves, O., Valente, J. (2009). Behçet's disease—a contemporary review. *Journal of Autoimmunity*, 32(3-4), 178-188. [\[CrossRef\]](#)
 46. Quax, R., van Laar, J., Van Heerebeek, R., Greiner, K., Ben-Chetrit, E., Stanford, M., Wallace, G., Fortune, F., Ghabra, M., Soylyu, M. (2012). Glucocorticoid sensitivity in Behçet's disease. *Endocrine Connections*, 1(2), 103-111. [\[CrossRef\]](#)
 47. Merashli, M., El Eid, R., Uthman, I. (2018). A review of current management of vasculo-Behçet's. *Current Opinion in Rheumatology*, 30(1), 50-56. [\[CrossRef\]](#)
 48. Leung, Y.Y., Hui, L.L.Y., Kraus, V.B. (2015). Colchicine—update on mechanisms of action and therapeutic uses. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 45(3), 341-350 [\[CrossRef\]](#)
 49. Marques-da-Silva, C., Chaves, M., Castro, N., Coutinho-Silva, R., Guimaraes, M. (2011). Colchicine inhibits cationic dye uptake induced by ATP in P2X2 and P2X7 receptor-expressing cells: implications for its therapeutic action. *British Journal of Pharmacology*, 163(5), 912-926. [\[CrossRef\]](#)
 50. Yazici, H., Seyahi, E., Hatemi, G., Yazici, Y. (2018). Behçet syndrome: a contemporary view. *Nature Reviews Rheumatology*, 14(2), 107-119. [\[CrossRef\]](#)
 51. Singh, J., Yang, S., Foster, J. (2014). The risk of aplastic anemia and pancytopenia with colchicine: a retrospective study of integrated health system database. *Arthritis & Rheumatology*, 66, 20. [\[CrossRef\]](#)

52. Hatemi, G., Melikoglu, M., Tunc, R., Korkmaz, C., Turgut Ozturk, B., Mat, C., Merkel, P.A., Calamia, K.T., Liu, Z., Pineda, L. (2015). Apremilast for Behçet's syndrome—a phase 2, placebo-controlled study. *New England Journal of Medicine*, 372(16), 1510-1518. [\[CrossRef\]](#)
53. Hatemi, G., Mahr, A., Takeno, M., Kim, D.-Y., Melikoglu, M., Cheng, S., McCue, S., Paris, M., Wang, Y., Yazici, Y. (2018). OP0082 Apremilast for Behçet's syndrome: a phase iii randomised, placebo-controlled, double-blind study (RELIEF). *Annals of the Rheumatic Diseases*, 77(Suppl. 2), 91-92. [\[CrossRef\]](#)
54. Takeno, M. (2020). Positioning of apremilast in treatment of Behçet's disease. *Modern Rheumatology*, 30(2), 219-224. [\[CrossRef\]](#)
55. Broen, J.C., van Laar, J.M. (2020). Mycophenolate mofetil, azathioprine and tacrolimus: mechanisms in rheumatology. *Nature Reviews Rheumatology*, 16(3), 167-178. [\[CrossRef\]](#)
56. Davatchi, F., Shahram, F., Chams, H., Akbarian, M. (1999). Pulse cyclophosphamide (PCP) for ocular lesions of Behçet's disease: double blind crossover study. *Arthritis and Rheumatism*, 42(9), S320-S320. [\[CrossRef\]](#)
57. Ziccheddu, G., Proietti, E., Moschella, F. (2013). The janus face of cyclophosphamide: a sterile inflammatory response that potentiates cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*, 2(9), e25789. [\[CrossRef\]](#)
58. Hegab, S., Al-Mutawa, S. (2000). Immunopathogenesis of Behçet's disease. *Clinical Immunology*, 96(3), 174-186. [\[CrossRef\]](#)
59. Hatemi, G., Christensen, R., Bang, D., Bodaghi, B., Celik, A.F., Fortune, F., Gaudric, J., Gul, A., Kötter, I., Leccese, P. (2018). 2018 update of the EULAR recommendations for the management of Behçet's syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 77(6), 808-818. [\[CrossRef\]](#)
60. Alpsyoy, E., Akman, A. (2006). Treatment of Behcet's disease. *Clinical Practice*, 3(1), 139. [\[CrossRef\]](#)
61. Greiner, K., Dick, A.D. (2016). Tacrolimus. In: Zierhut, M., Pavesio, C., Ohno S., Orefice, F., Rao, N.A.(Eds.), *Intraocular inflammation*, (pp. 379-384). Berlin, Heidelberg: Springer. [\[CrossRef\]](#)
62. Başı, Y. (2009). PhD Thesis. Clinical and Demographic Findings in Behçet's Disease. Skin and Venereal Diseases Clinic, Haseki Training and Research Hospital Istanbul, Turkey. [\[CrossRef\]](#)
63. Köse, O. (2012). Development of immunopathogenesis strategies to treat Behçet's disease. *Pathology Research International*, 2012, 261989. [\[CrossRef\]](#)
64. Wolf, R., Matz, H., Orion, E., Tuzun, B., Tuzun, Y. (2002). Dapsone. *Dermatology Online Journal*, 8(1), 2. [\[CrossRef\]](#)
65. Kurien, G., Jamil, R.T., Preuss, C.V. (2021). Dapsone. *StatPearls*. From <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470552/> Retrieved: 09.03.2022 [\[CrossRef\]](#)
66. Saleh, Z., Arayssi, T. (2014). Update on the therapy of Behçet disease. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 5(3), 112-134. [\[CrossRef\]](#)

67. Cronstein, B.N., Aune, T.M. (2020). Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 16(3), 145-154. [\[CrossRef\]](#)
68. Chan, E.S., Cronstein, B.N. (2010). Methotrexate—how does it really work? *Nature Reviews Rheumatology*, 6(3), 175-178. [\[CrossRef\]](#)
69. Markomichelakis, N., Delicha, E., Masselos, S., Fragiadaki, K., Kaklamanis, P., Sfikakis, P.P. (2011). A single infliximab infusion vs corticosteroids for acute panuveitis attacks in Behçet's disease: a comparative 4-week study. *Rheumatology*, 50(3), 593-597. [\[CrossRef\]](#)
70. Iwata, S., Saito, K., Yamaoka, K., Tsujimura, S., Nawata, M., Suzuki, K., Tanaka, Y. (2009). Effects of anti-TNF- α antibody infliximab in refractory entero-Behçet's disease. *Rheumatology*, 48(8), 1012-1013. [\[CrossRef\]](#)
71. Sfikakis, P., Kaklamanis, P., Elezoglou, A., Katsilambros, N., Theodossiadis, P., Papaefthimiou, S., Markomichelakis, N. (2004). Infliximab for recurrent, sight-threatening ocular inflammation in Adamantiades–Behçet disease. *Annals of Internal Medicine*, 140(5), 404-406. [\[CrossRef\]](#)
72. Marotte, H., Cimaz, R. (2014). Etanercept–TNF receptor and IgG1 Fc fusion protein: is it different from other TNF blockers? *Expert Opinion on Biological Therapy*, 14(5), 569-572. [\[CrossRef\]](#)
73. Murray, P., Sivaraj, R. (2005). Anti-TNF- α therapy for uveitis: Behçet and beyond. *Eye*, 19(8), 831-833. [\[CrossRef\]](#)
74. Emmi, G., Vitale, A., Silvestri, E., Boddi, M., Becatti, M., Fiorillo, C., Fabiani, C., Frediani, B., Emmi, L., Di Scala, G. (2018). Adalimumab-based treatment versus disease-modifying antirheumatic drugs for venous thrombosis in Behçet's syndrome: a retrospective study of seventy patients with vascular involvement. *Arthritis & Rheumatology*, 70(9), 1500-1507. [\[CrossRef\]](#)
75. Hirano, T., Ohguro, N., Hohki, S., Hagihara, K., Shima, Y., Narazaki, M., Ogata, A., Yoshizaki, K., Kumanogoh, A., Kishimoto, T. (2012). A case of Behçet's disease treated with a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody, tocilizumab. *Modern Rheumatology*, 22(2), 298-302. [\[CrossRef\]](#)
76. Zekarias, M. (2020). MSc thesis. Characterization of rituximab-induced B cell depletion and infusion reactions in a human blood loop system. Department of Pharmaceutical Biosciences, Faculty of Pharmacy, Uppsala University, Uppsala, Sweden. [\[CrossRef\]](#)
77. Hamuryudan, V., Kötter, I., Tüzün, H. (2020). Disease Management. In: Y. Yazici, G. Hatemi, E. Seyahi, H. Yazici (Eds.), Behçet Syndrome (pp. 279-305). Switzerland: Springer, Cham. [\[CrossRef\]](#)
78. Bandala-Sanchez, E., Zhang, Y., Reinwald, S., Dromey, J.A., Lee, B.-H., Qian, J., Böhmer, R.M., Harrison, L.C. (2013). T cell regulation mediated by interaction of soluble CD52 with the inhibitory receptor Siglec-10. *Nature Immunology*, 14(7), 741-748. [\[CrossRef\]](#)
79. Rao, S.P., Sancho, J., Campos-Rivera, J., Boutin, P.M., Severy, P.B., Weeden, T., Shankara, S., Roberts, B.L., Kaplan, J.M. (2012). Human peripheral blood mononuclear cells exhibit heterogeneous CD52 expression levels and show differential sensitivity to alemtuzumab mediated cytotoxicity. *Plos One*, 7(6), e39416. [\[CrossRef\]](#)

80. van der Zwan, M., Clahsen-Van Groningen, M.C., van den Hoogen, M.W.F., Kho, M.M.L., Roodnat, J.I., Mauff, K.A.L., Roelen, D.L., van Agteren, M., Baan, C.C., Hesselink, D.A. (2020). Comparison of alemtuzumab and anti-thymocyte globulin treatment for acute kidney allograft rejection. *Frontiers in Immunology*, 11, 1-11. [\[CrossRef\]](#)
81. Gold, R., Giovannoni, G., Selmaj, K., Havrdova, E., Montalban, X., Radue, E.-W., Stefoski, D., Robinson, R., Riestler, K., Rana, J. (2013). Daclizumab high-yield process in relapsing-remitting multiple sclerosis (SELECT): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 381(9884), 2167-2175. [\[CrossRef\]](#)
82. Nishimoto, N., Kishimoto, T. (2008). Humanized antihuman IL-6 receptor antibody, tocilizumab. *Therapeutic Antibodies*, 151-160. [\[CrossRef\]](#)
83. Shapiro, L.S., Farrell, J., Haghighi, A.B. (2012). Tocilizumab treatment for neuro-Behçet's disease, the first report. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 3(114), 297-298. [\[CrossRef\]](#)
84. Urbaniak, P., Hasler, P., Kretschmar, S. (2012). Case report Refractory neuro-Behçet treated by tocilizumab: a case report. *Clinical and Experimental Rheumatology* 30(72), S73-S75. [\[CrossRef\]](#)
85. Atienza-Mateo, B., Calvo-Río, V., Beltrán, E., Martínez-Costa, L., Valls-Pascual, E., Hernández-Garfella, M., Atanes, A., Cordero-Coma, M., Miquel Nolla, J., Carrasco-Cubero, C. (2018). Anti-interleukin 6 receptor tocilizumab in refractory uveitis associated with Behçet's disease: multicentre retrospective study. *Rheumatology*, 57(5), 856-864. [\[CrossRef\]](#)
86. Ding, Y., Li, C., Liu, J., Yu, X., Wang, Y., Shi, J., Li, L., Zhou, J., Wang, L., Chen, H. (2018). Tocilizumab in the treatment of severe and/or refractory vasculo-Behçet's disease: a single-centre experience in China. *Rheumatology*, 57(11), 2057-2059. [\[CrossRef\]](#)
87. Yazici, Y. (2020). Management of Behçet syndrome. *Current Opinion in Rheumatology*, 32(1), 35-40. [\[CrossRef\]](#)
88. Lønnberg, A.S., Zachariae, C., Skov, L. (2014). Targeting of interleukin-17 in the treatment of psoriasis. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 7, 251. [\[CrossRef\]](#)
89. Hueber, W., Patel, D.D., Dryja, T., Wright, A.M., Koroleva, I., Bruin, G., Antoni, C., Draelos, Z., Gold, M.H., Group, P.S. (2010). Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Science Translational Medicine*, 2(52), 1-9. [\[CrossRef\]](#)
90. Blauvelt, A. (2016). Safety of secukinumab in the treatment of psoriasis. *Expert Opinion on Drug Safety*, 15(10), 1413-1420. [\[CrossRef\]](#)
91. Cavalli, G., Dinarello, C.A. (2018). Anakinra therapy for non-cancer inflammatory diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1-21. [\[CrossRef\]](#)
92. Caso, F., Costa, L., Rigante, D., Lucherini, O.M., Caso, P., Bascherini, V., Frediani, B., Cimaz, R., Marrani, E., Nieves-Martín, L. (2014). Biological treatments in Behçet's disease: beyond anti-TNF therapy. *Mediators of Inflammation*, 2014, 107421. [\[CrossRef\]](#)
93. Emmi, G., Silvestri, E., Cameli, A., Bacherini, D., Vannozzi, L., Squatrito, D., Emmi, L. (2013). Anakinra for resistant Behçet uveitis: why not? *Clinical and Experimental Rheumatology*, 31(3 Suppl. 77), 152-153. [\[CrossRef\]](#)

94. Dinarello, C.A., van der Meer, J.W. (2013). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Seminars in Immunology*, 25(6), 469-484. [[CrossRef](#)]
95. Gül, A., Tugal-Tutkun, I., Dinarello, C.A., Reznikov, L., Esen, B.A., Mirza, A., Scannon, P., Solinger, A. (2012). Interleukin-1 β -regulating antibody XOMA 052 (gevokizumab) in the treatment of acute exacerbations of resistant uveitis of Behçet's disease: an open-label pilot study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 71(4), 563-566. [[CrossRef](#)]
96. Tugal-Tutkun, I., Kadayifcilar, S., Khairallah, M., Lee, S.C., Ozdal, P., Özyazgan, Y., Song, J.H., Yu, H.G., Lehner, V., de Cordoue, A. (2017). Safety and efficacy of gevokizumab in patients with Behçet's disease uveitis: results of an exploratory phase 2 study. *Ocular Immunology and Inflammation*, 25(1), 62-70. [[CrossRef](#)]
97. Dhimolea, E. (2010). Canakinumab. *MAbs*, 2(1), 3-13. [[CrossRef](#)]
98. Cantarini, L., Vitale, A., Borri, M., Galeazzi, M., Franceschini, R. (2012). Successful use of canakinumab in a patient with resistant Behçet's disease. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 30(3 Suppl. 72), S115. [[CrossRef](#)]
99. Emmi, G., Talarico, R., Lopalco, G., Cimaz, R., Cantini, F., Viapiana, O., Olivieri, I., Goldoni, M., Vitale, A., Silvestri, E. (2016). Efficacy and safety profile of anti-interleukin-1 treatment in Behçet's disease: a multicenter retrospective study. *Clinical Rheumatology*, 35(5), 1281-1286. [[CrossRef](#)]
100. Cohen, M.D., Keystone, E.C. (2014). Intravenous golimumab in rheumatoid arthritis. *Expert Review of Clinical Immunology*, 10(7), 823-830. [[CrossRef](#)]
101. Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E. H., Salfeld, J.G., Tak, P.P. (2008). Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacology Therapeutics*, 117(2), 244-279. [[CrossRef](#)]
102. Mesquida, M., Victoria Hernández, M., Llorenç, V., Pelegrín, L., Espinosa, G., Dick, A.D., Adán, A. (2013). Behçet disease-associated uveitis successfully treated with golimumab. *Ocular Immunology and Inflammation*, 21(2), 160-162. [[CrossRef](#)]
103. Santos-Gómez, M., Calvo-Río, V., Blanco, R., Beltrán, E., Mesquida, M., Adán, A., Cordero-Coma, M., García-Aparicio, Á., Pascual, E.V., Martínez-Costa, L. (2016). The effect of biologic therapy different from infliximab or adalimumab in patients with refractory uveitis due to Behçet's disease: results of a multicentre open-label study. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 34(6 Suppl. 102), 34-40. [[CrossRef](#)]
104. Blick, S.K., Curran, M.P. (2007). Certolizumab pegol. *BioDrugs*, 21(3), 195-201. [[CrossRef](#)]
105. Sandborn, W.J. (2005). New concepts in anti-tumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease. *Reviews in Gastroenterological Disorders*, 5(1), 10-18. [[CrossRef](#)]
106. Weir, N., Athwal, D., Brown, D., Foulkes, R., Kollias, G., Nesbitt, A., Popplewell, A., Spitali, M., Stephens, S. (2006). A new generation of high-affinity humanized PEGylated Fab'' fragment anti-tumor necrosis factor-[alpha] monoclonal antibodies. *Therapy*, 3(4), 535. [[CrossRef](#)]
107. Lopalco, G., Emmi, G., Gentileschi, S., Guerriero, S., Vitale, A., Silvestri, E., Becatti, M., Cavallo, I., Fabiani, C., Frediani, B. (2017). Certolizumab pegol treatment in Behçet's disease

- with different organ involvement: A multicenter retrospective observational study. *Modern Rheumatology*, 27(6), 1031-1035. [\[CrossRef\]](#)
108. Nia, J.K., Lebwohl, M.G. (2016). Chapter 11 - Ustekinumab. In J.J. Wu, S.R. Feldman, M. G. Lebwohl (Eds.), *Therapy for Severe Psoriasis*, (pp. 127-137). Amsterdam: Elsevier. [\[CrossRef\]](#)
109. Mirouse, A., Barete, S., Monfort, J.-B., Resche-Rigon, M., Bouyer, A.-S., Comarmond, C., Sène, D., Domont, F., Ferfar, Y., Cacoub, P. (2017). Ustekinumab for Behçet's disease. *Journal of Autoimmunity*, 82, 41-46. [\[CrossRef\]](#)
110. Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J., Steinhart, A. H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A. (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*, 314(5804), 1461-1463. [\[CrossRef\]](#)
111. Alexoudi, I., Kapsimali, V., Vaiopoulos, A., Kanakis, M., Vaiopoulos, G. (2011). Evaluation of current therapeutic strategies in Behçet's disease. *Clinical Rheumatology*, 30(2), 157-163. [\[CrossRef\]](#)
112. Houman, M., Hamzaoui, K. (2006). Promising new therapies for Behçet's disease. *European Journal of Internal Medicine*, 17(3), 163-169. [\[CrossRef\]](#)
113. Kudur, M.H., Hulmani, M. (2013). Rebamipide: A novel agent in the treatment of recurrent aphthous ulcer and Behçet's syndrome. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 58(5), 352. [\[CrossRef\]](#)
114. Matsuda, T., Ohno, S., Hirohata, S., Miyanaga, Y., Ujihara, H., Inaba, G., Nakamura, S., Tanaka, S.-i., Kogure, M., Mizushima, Y. (2003). Efficacy of rebamipide as adjunctive therapy in the treatment of recurrent oral aphthous ulcers in patients with Behçet's disease. *Drugs R&D*, 4(1), 19-28. [\[CrossRef\]](#)
115. Alsberg, C., Black, O.F. (1913). Contributions to the study of maize deterioration: biochemical and toxicological investigations of *Penicillium puberulum* and *Penicillium stoloniferum*, US Government Printing Office. Washington, p.48. [\[CrossRef\]](#)
116. Gong, Z., De Meyer, S., Clarysse, C., Verslype, C., Neyts, J., De Clercq, E., Yap, S.H. (1999). Mycophenolic acid, an immunosuppressive agent, inhibits HBV replication in vitro. *Journal of Viral Hepatitis*, 6(3), 229-236. [\[CrossRef\]](#)
117. Allison, A., Eugui, E. (1991). Immunosuppressive and long-acting anti-inflammatory activity of mycophenolic acid and derivative, RS-61443. *British Journal of Rheumatology*, 30, 57-61. [\[CrossRef\]](#)
118. Lipsky, J.J. (1996). Mycophenolate mofetil. *The Lancet*, 348(9038), 1357-1359. [\[CrossRef\]](#)
119. Ransom, J.T. (1995). Mechanism of action of mycophenolate mofetil. *Therapeutic Drug Monitoring*, 17(6), 681-684. [\[CrossRef\]](#)
120. Mehling, A., Grabbe, S., Voskort, M., Schwarz, T., Luger, T.A., Beissert, S. (2000). Mycophenolate mofetil impairs the maturation and function of murine dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 165(5), 2374-2381. [\[CrossRef\]](#)
121. Bang, D. (1997). Treatment of Behçet's disease. *Yonsei Medical Journal*, 38(6), 401-410. [\[CrossRef\]](#)

122. Can, M., Direskeneli, H. (2009). Musculo-skeletal and vascular involvement in Behçet's disease. *Turkderm-Archives of the Turkish Dermatology Venerology*, 43(Suppl. 2), 54-60. [\[CrossRef\]](#)
123. Gupta, M. (2016). Levamisole: A multi-faceted drug in dermatology. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 82(2). [\[CrossRef\]](#)
124. Mushtaq, S., Sarkar, R. (2020). Sulfasalazine in dermatology: a lesser explored drug with broad therapeutic potential. *International Journal of Women's Dermatology*, 6(3), 191-198. [\[CrossRef\]](#)
125. Sharquie, K.E., Najim, R.A., Al-Dori, W.S., Al-Hayani, R.K. (2006). Oral zinc sulfate in the treatment of Behcet's disease: a double blind cross-over study. *The Journal of Dermatology*, 33(8), 541-546. [\[CrossRef\]](#)
126. Yasui, K., Ohta, K., Kobayashi, M., Aizawa, T., Komiyama, A. (1996). Successful treatment of Behçet disease with pentoxifylline. *Annals of Internal Medicine*, 124(10), 891-893. [\[CrossRef\]](#)
127. Calgüneri, M., Ertenli, I., Kiraz, S., Erman, M., Celik, I. (1996). Effect of prophylactic benzathine penicillin on mucocutaneous symptoms of Behçet's disease. *Dermatology*, 192(2), 125-128. [\[CrossRef\]](#)
128. Soyulu, M., Demircan, N., Pelit, A. (2001). Pars plana vitrectomy in ocular Behcet's disease. *International Ophthalmology*, 24(4), 219-223. [\[CrossRef\]](#)



COVID-19 YAYILMASINDA ARKADAŞ HAYVANLARIN ROLÜ

THE ROLE OF COMPANION ANIMALS IN SPREADING COVID-19

Nilgün ÜNAL^{1*} 

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı,
06018, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Yirmi birinci yüzyılda, sağlık alanındaki aşı ve terapötik ajanlarla ilgili gelişmeler ve enfeksiyon yönetimindeki iyileştirmelere rağmen hala insan ve hayvanlarda ölümcül olabilen yeni viral salgınlar ortaya çıkmaktadır. Yarasa kökenli olan ve ara konağı hala tartışılan, zoonoz COVID-19 enfeksiyonu Aralık 2019 yılında Çin'in Wuhan eyaletinde bir hayvan pazarı ziyaret geçmişi olan insanlarda ortaya çıkmıştır. Dünya Sağlık Örgütü, Şubat 2020 tarihinde hastalığın pandemik bir enfeksiyon olduğunu ilan etmiştir. Milyonlarca insan bu salgından etkilenmiştir. Salgın mücadelesinin ekonomik yönden büyük maliyeti olmuş ve olmaya da devam etmektedir. İnsanlar yaşam rutinlerini değiştirmiştir. Bu süreçte arkadaş (companion) hayvanların insanlarla yakın ilişkisi dolayısıyla COVID-19 hastalığına yakalanması, etkeni taşınması, tekrar insanlara bulaştırması ile ilgili kaygılar yaşanmaktadır. Bu derlemenin amacı kedi, köpek, hamster ve atlar gibi arkadaş hayvanlarda COVID-19 varlığı ve bulaşı ile ilgili çalışmaların incelenmesidir.

Sonuç ve Tartışma: Yapılan çalışmalarda arkadaş hayvanların çoğunun (kedi, köpek ve hamster) SARS-CoV-2'ye duyarlı olduğu ve insanların onlar için bir enfeksiyon kaynağı olabileceği bildirilmiştir. Ancak arkadaş hayvanların insanlara hastalık bulaştırmasındaki potansiyel rolü tam olarak bilinmemektedir. Bu son salgında, enfeksiyöz etkenlerin özellikle zoonoz olanlarının tek sağlık konseptinde epidemiyolojik olarak araştırılmasının gerekliliği bir kez daha ortaya çıkmıştır.

Anahtar Kelimeler: Arkadaş hayvanlar, COVID-19, Tek sağlık

ABSTRACT

Objective: In the twenty-first century, despite the development in infection management, and improvement of vaccines and therapeutic agents in the field of health, new viral outbreaks that can still be fatal in humans and animals are emerging. The infection of zoonosis COVID-19 from bat origin, the intermediate host of which is still being unclear, has appeared in people who visited animal bazaar in December 2019, in Wuhan, China. The World Health Organization declared this infection a pandemic in February 2020. Millions of people have been affected by this pandemic. The fight against the pandemic has had a great economic cost and continues to do so. Even people have changed their lifestyle. In this context,

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Nilgün Ünal
e-posta / e-mail: nilgun.unal@sbu.edu.tr, Tel. / Phone: +90 533 571 01 44

there have been concerns about companion animals with COVID-19 transmission, from human to animal or animal to human. The purpose of this review was to examine the studies on the presence and transmission of COVID-19 in companion animals such as cats, dogs, hamsters and horses.

Result and Discussion: It has been reported in studies that most of the companion animals (cat, dog and hamster) were susceptible to SARS-CoV-2, and humans could be a source of infection for them. However, the potential role of companion animals in transmission to humans is not fully known. It is clear from this pandemic that the necessity of epidemiological investigation of infectious agents, especially zoonotic ones, in one health concept has emerged once again.

Keywords: Companion animals, COVID-19, One health

GİRİŞ

Koronavirüsler (CoV), insanlarda mevsimsel, hafif, üst veya alt solunum yolları enfeksiyonları, zatürre ve bronşite yol açabilen virüslerken, son yirmi yılda yarasa orjinli, zoonoz özellikli üç koronavirüs salgını ortaya çıkmış ve insanlar arasında yayılmıştır. Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü (SARS-CoV) 2002 yılında Çin’de, Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü (MERS-CoV) 2012 yılında Orta Doğu’da ve son olarak da Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü-2 (SARS-CoV-2) yine Çin’de (2019) ortaya çıkmıştır. COVID-19 olarak adlandırılan son salgın da yarasa orjinli olup ara konağı hala tartışılan bir koronavirüstür [1,2].

Koronavirüsler, yuvarlak, zarflı, yüzeylerinde çıkıntılar olan virüslerdir. Latince’deki ismi “corona”, yani “taç” benzeri uzantılarından dolayı bu ismi almıştır. Koronavirüsler, 50–200 nm büyüklüğündedir. Viral nükleik asit, pozitif sense/polarite, tek iplikçikli ve 26-32 kilobaz olup şimdiye kadar tanımlanmış en büyük viral RNA taşıyan virüstür [3].

Koronavirüsler, *Nidovirales* takımında *Coronaviridae* ailesi içerisinde yer almaktadır. *Orthocoronavirinae* alt ailesi içerisindeki virüsler, genetik ve serolojik özelliklerine göre *Alpha-*, *Beta*, *Gamma-* ve *Deltacoronavirus* (α -, β -, γ -, δ -CoV) olmak üzere dört cinse ayrılırlar. Bazı Alfakoronavirüsler (HCoV-NL63, HCoV-229E) ve Betakoronavirüsler (HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV-1, MERS-CoV ve son yıllarda SARS-CoV-2) insanlarda üst solunum yolu ve gastrointestinal sistemleri etkileyerek, asemptomatik veya ciddi klinik tablolara neden olabilmekte hatta ölümle sonuçlanabilmektedir [1,2].

Koronavirüslerin genom yapıları birbirlerine çok benzerdir. Pozitif sens yani aynı zamanda mRNA olarak görev yapan nükleik asit, 5' Untranslated region (UTR) ucundan itibaren, Open Reading Frame 1ab (ORF1ab) bölgesi (ORF1ab bölgesinden translate edilen poliprotein 1a ve 1b'den posttranslasyonel işlemlerle 1-15 veya 16 ‘ya kadar isimlendirilen yapısal olmayan proteinler üretilir), sonra sırasıyla hemagglutinin-esteraz (HE, bazı betakoronavirüslerde), başak (S), zarf (E), zar (M) ve nükleoprotein (N) olarak isimlendirilen yapısal proteinler, aksesuar proteinler ve en son 3' -UTR bölgelerini kodlamaktadır [4].

Çiftlik ve pet hayvanlarında koronavirüsler, ensefalomyelit, hepatit, nefrit ve peritonite kadar değişen klinik semptomlarla gastrointestinal, solunum ve merkezi sinir sistemleri etkileyebilen çok fazla hastalığa neden olmaktadır. İlginç bir şekilde, insanlardan izole edilen CoV'ler, evcil hayvanlardan, özellikle sığırlar ve devegiller, vahşi yaşamda da, yarasalardan izole edilen CoV'ler ile filogenetik olarak ilişkilidir. Bu durum, CoV'lerin, hayvan rezervuarlarından türler arası geçişi, ekolojisi ve evrimi hakkında daha derin araştırmalara ihtiyacın altını çizmektedir [5]. İnsanlarla yakın ilişkide ve temasta olan kediler, köpekler, yaban gelinciği hatta atlar ve alpakalar arkadaş (companion) hayvanlar olarak tanımlanmaktadır [6].

Tablo 1. Koronavirüs cinsleri ve buldukları hayvan türleri [7].

Konakçı	Alfakoronavirüs	Betakoronavirüs	Gammakoronavirüs	Deltakoronavirüs
İnsan	İnsan CoV-229E, İnsan CoV-NL63	İnsan CoV-OC43 İnsan CoV-HKU1		
Yarasa kökenli (İnsan salgınları)		SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV		
Kediler	Kedi CoV			
Köpekler	Köpek enterik CoV	Köpek respiratorik CoV		
Domuzlar	Domuz epidemik diyare CoV, Domuz respiratorik CoV, Bulaşıcı Gastroenterit virüsü	Domuz hemaglutinasyon ensefalomyelit virüsü		Domuz CoV HKU15
Çift tırnaklılar (Ruminantlar)		Sığır CoV, Antilop CoV, Zürafa CoV		
Tek tırnaklılar (Equide)		At CoV		
Yarasa (bat)	Çeşitli Yarasa CoVs	Üç Yarasa CoVs		
Kanatlılar			Hindi infeksiyöz bronşit virüsü	9 Kanatlı hayvan CoVs
Diğer		Kirpi CoV HKU31, Pangolin CoV'si	Beluga balinası CoV-SW1	

Alphacoronavirus/α-CoV (önceden grup 1 koronavirüsler olarak isimlendirilmiştir) içerisinde, respiratorik, enterik, hepatik ve nörolojik semptomlara neden olabilen kedi koronavirüsü (*Feline Coronavirus/FCoV*) ve köpeklerde enterik formda enfeksiyon meydana getiren köpek koronavirüsü (*Canine Coronavirus /CCoV*) yanı sıra domuzlarda enterik klinik form ile ortaya çıkan domuzların bulaşıcı gastroenterit virüsü (*Transmissible Gastroenteritis Virus /TGEV*), domuz akut diyare sendromu (*Swine Acute Diarrhea Syndrome-Coronavirus/SADS-CoV*) virüsü, domuz ishal salgını virüsü (*Porcine Epidemic Diarrhea Virus /PEDV*) ile yine domuzlarda solunum yolunda klinik semptomla ortaya çıkan domuz solunum koronavirüsleri (*Porcine Respiratory Coronavirus/PRCV*) yer almaktadır. Bu cins içerisinde respiratorik formda enfeksiyonlara neden olan insan koronavirüsleri (*Human*

Coronavirus 229E/HCoV-229E ve Human *Coronavirus* NL63/HCoV-NL63) ile yarasa koronavirüsleri (Bat CoV) de yer almaktadır (Tablo1) [7,8].

Betacoronavirus/β-CoV (önceden grup 2 koronavirüsler olarak isimlendirilmiştir): Betakoronavirüs cinsi içerisinde yer alan virüsler, *Betacoronavirus* grup A, B, C ve D olmak üzere 4 alt cinse ayrılmaktadır.

Betacoronavirus grup A (*Embecovirus* alt cinsi)'da hepatik, enterik, respiratorik ve nörolojik formlarda orataya çıkabilen fare hepatit virüsü (Murine Hepatitis Virus /MHV), sıçan (sialodakriyoadenit) koronavirüsü, enterik formda klinik belirtiler yapan sığır koronavirüsleri (Bovine *Coronavirus* /BCoV) ve respiratorik özellikli at koronavirüsleri (Equine *Coronavirus* /ECoV) yanı sıra respiratorik ve nörolojik belirtileri olan domuzlarda hemagglütinasyon ensefalomyelit virüsü (Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus/PHEV) ile köpeklerde respiratorik formda enfeksiyonlar yapabilen köpek solunum yolu koronavirüsü (Canine Respiratory *Coronavirus*/(CRCoV) yer almaktadır. Bu grupta respiratorik (Human *Coronavirus* OC43/HCoV-OC43, Human *Coronavirus* HKU-1/HCoV-HKU1) ve enterik (Human Enteric *Coronavirus*-4408 -HECoV-4408) insan koronavirüsleri de bulunmaktadır [7,8,9].

Betacoronavirus grup B (*Sargencovirus* alt cinsi)' de zoonoz özellikli yarasalardan ara konaklarına ve onlardan insanlara bulaşan respiratorik ve enterik enfeksiyonlara neden olabilen insan SARS koronavirüsleri (Severe Acute Respiratory Syndrome *Coronavirus*/SARS-CoV ve Severe Acute Respiratory Syndrome *Coronavirus*-2/SARS-CoV-2) ve Bat SL-CoV-WIV1 gibi at nalı yarasa koronavirüsleri yer alırlar [7].

Betacoronavirus grup C (*Mergencovirus* alt cinsi)'de hem insanlardan hem de develerden bulaşan MERS koronavirüsü (Middle East Respiratory Syndrome-Related *Coronavirus*/MERS-CoV) yer almaktadır. Yarasa koronavirüsleri ile yakın ilişkili oldukları ortaya konmuştur [7].

Betacoronavirus grup D (*Nobecovirus* alt cinsi) yalnızca yarasaların koronavirüslerini içerir.

Gammacoronavirus/γ-CoV (önceden grup 3 koronavirüsler), içerisinde en bilinenleri respiratolik, enterik ve hepatik formda ortaya çıkan enfeksiyonlara neden olan kanatlı enfeksiyöz bronşit virüsü (Infectious Bronchitis Virus /IBV), enterik formdaki hindi koronavirüsü (Turkey *Coronavirus*/TCoV) ile yunuslar ve balinalar da dahil olmak üzere yabani kuşlar ve deniz memelilerinden izole edilen yeni türler bulunmaktadır [9,10].

Deltacoronavirus/δ-CoV (Daha yakın zamanda tanımlanan cins) içerisinde de domuzlardan (Porcine *Deltacoronavirus*/PDCoV) ve yabani kuşların yanı sıra, Asya leopar kedisinden izole edilen çeşitli virüsler yer almaktadır [10,11]. Lednicky ve ark. (2021) ile Kong ve ark. (2022) yaptıkları çalışmalarda domuzlarda enfeksiyon yapan deltakoronavirüslerin insanlarda enfeksiyonlara neden

olacak zoonoz bir özellik kazanma potansiyeli olduklarını vurgulamışlardır [11,12].

Önümüzdeki yıllarda koronavirüslerin daha fazla taksonomik alt bölümlerinin gelmesi muhtemeldir. Günümüzde sıcakkanlı uçan omurgalıların (kanatlıların) koronavirüslerin kesin konakçıları olduğuna inanılıyor. Alfa ve betakoronavirüslerin kökeni yarasalar, gama ve delta koronavirüslerin kökeni ise kuşlardır. *Rhinolophus* yarasalarında (at nalı yarasalarında) SARS-CoV-2'ye çok benzeyen betakoronavirüsler belirlenmiş ve kaynağının yarasalar olduğu ve ara konağının da pangolin olabileceği düşünülse de hala kesinleşmemiş olup insanlara bulaştığı bildirilmiştir [13,14].

Arkadaş Hayvanlarda ve İnsanlarda Bulunan Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2 (ACE-2) Reseptör Benzerliği

Bazı hayvan türlerinin, SARS-CoV-2 ile nasıl enfekte olabildiğini anlamak için enfeksiyonun oluşmasında son derece önemli olan virüsün enfekte ettiği hücrelerdeki ACE-2 reseptörlerine bağlanarak membran füzyonu oluşumunu anlamak gereklidir. SARS-CoV-2 virüsü hücrelere bağlanırken virüsün S proteini üzerinde bulunan reseptör bağlama alanı (Receptor Binding Domain) ile hücreler üzerinde bulunan ACE-2 reseptörünün 22 aminoasitlik dizisi temasa geçmektedir. Bazı evcil ve vahşi hayvanlardaki ACE-2 reseptörlerinin bağlama bölgelerindeki amino asit dizileri ile insan ACE-2 reseptörünün amino asit dizileri karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak da insan ACE-2 reseptörüne araştırılan hayvanların ACE-2 reseptör benzerlikleri, şempanzede %99.4, maymunda %97.5, golden Suriye hamsterında %91.7, evcil kedide %88.3, inekte %90.6, koyunda %90.8, tavşanda %92.8, Çin hamsterında %91.6, pangolinde %91.3, evcil köpekte %91.8, atta %93.4; domuzda %90.7 ve gelincikte %91.6 oranlarında bulunmuştur [8, 15].

İnsanlarda bulunan hücresel ACE-2 reseptörüne benzer reseptörlere sahip farklı hayvan türleri, domuzlar, gelincikler, kediler, orangutanlar, maymunlar SARS-CoV-2'nin yayılmasında rol alabilirler. ACE-2 reseptörlerindeki farklılığa bağlı olarak farklı hayvan türlerinde COVID-19'a farkı duyarlılık görülmektedir [16]. Bu nedenle, hayvanlar aracılığıyla SARS-CoV-2'nin yayılma olasılığı vardır [15]. SARS-CoV-2'nin yarasadan insana evrimi sırasında yarasaları yiyen köpeklerin ikincil konaklar olabileceği hipotezi ortaya konulmuştur [17]. SARS-CoV-2 virüsü ile yapılan deneysel çalışmalarla da kedi ve gelinciklerin çok duyarlı olduğu gösterilmiştir [18].

Köpeklerde SARS-CoV-2 Enfeksiyonları

SARS-CoV-2 enfeksiyonu ilk olarak Çin'de, Hong Kong Tarım, Balıkçılık ve Koruma Dairesi (AFCD) tarafından 17 yaşında birkaç komorbiditesi olan erkek Pomeranian ırkı asemptomatik köpekte rapor edilmiştir (26 Şubat 2020'de karantinaya alındı). Daha sonra bu köpeğin sahibine COVID-19 teşhisi konulmuştur [19, 20]. Asemptomatik erkek 2.5 yaşında Alman çoban köpeğinin 18 Mart'ta, burun ve ağız sürüntü örneklerinden RT-qPCR ile SARS-CoV-2 pozitifliği tespit edilmiştir. Her iki

köpekte de SARS-CoV-2'ye karşı antikorların varlığı da ortaya konmuştur [21]. (Tablo-2). Bu hayvanların sahiplerinden etkeni aldıkları düşünülmüştür. İnsandan hayvana bulaşmayı (antropozoonoz) düşündüren ise hayvanlardan ve sahiplerinden izole edilen virüslerin nükleik asit dizilerinin aynı olmasıdır [22].

Hollanda'da, sahibi COVID-19 pozitif olan solunum sıkıntısı çeken 8 yaşındaki bir Amerikan Bulldog'da SARS-CoV-2'ye karşı nötralize edici antikorlar tespit edilmiştir [23]. Amerika'nın New York Eyaletinde de anti-SARS-CoV-2 antikorları pozitif iki köpek tespit edildi. Bir köpek solunum yolu hastalığı ve şiddetli hemolitik anemi ile ilişkili uyuşukluk belirtileri gösterirken diğer köpekte klinik belirti belirlenmemiştir. Her iki köpeğin sahibi de COVID-19 pozitif olarak tespit edilmiştir [24]. Amerika'da yapılan bir çalışmada ise 59 köpekten solunum yolu, rektal ve tüylerinden sürüntü örnekleri alınmış ve sadece 1 köpekte RT-qPCR ile SARS-CoV-2 viral RNA'sı tespit edilmiştir [25]. Yapılan çalışmalarda köpeklerin klinik belirti gösteren veya göstermeyen formlarla SARS-CoV-2 ile enfekte olabileceği rapor edilmiştir (Tablo-2).

Kedilerde SARS-CoV-2 Enfeksiyonları

Kedilerde ilk olarak, Belçika'da, diyare, kusma ve dispne belirtileri olan bir kedinin kusmuk ve dışkı örneklerinde RT-qPCR ile SARS CoV-2 viral RNA'sı tespit edilmiştir. Hayvan sahibi COVID-19 ile enfekte olmasına rağmen kedi ve insanda bulunan SARS-CoV-2 dizileri benzer bulunmamıştır. Bu kedi, hastalığın başlangıcından 9 gün sonra klinik iyileşme göstermiştir [26, 27]. Hong Kong'da Nisan 2020'de sahipleri COVID-19 olan, klinik olarak sağlıklı 17 kediden nazal-oral sürüntü ve dışkı örnekleri alınmış ve bir kedi RT-qPCR ile SARS-CoV-2 pozitif olarak tespit edilmiştir. SARS-CoV-2 pozitif bulunan kedinin sahibinin daha önce COVID-19 enfeksiyonu dolayısıyla hastanede tedavi gördüğü belirtilmiştir [28, 29, 30]. Yine Hong Kong' da Ağustos 2020'de yapılan başka bir çalışmada da çeşitli sürüntü örnekleri alınan 50 kedinin altısında CoV-2, RT-qPCR ile tespit edilmiştir [31]. Fransa'da Nisan 2020 tarihinde 22 kediden alınan rektal sürüntü örneklerinden birinde [32]. Amerika'da ise nasal sürüntü örneği alınan iki kedide RT-qPCR ile COVID-19 pozitif belirlenmiştir [33, 34] (Tablo 2).

Barrs ve ark. (2020) yaptıkları bir çalışmada kedilerden izole edilen SARS-CoV-2 etkenlerinin dizi analizi sonuçlarına göre %99.8 oranında sahiplerinden izole edilen etkenlerle benzer olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışma bulguları da insanlardan hayvanlara etkenin bulaşmasını desteklemektedir [31].

Kedilerin klinik belirtiler geliştirmese de SARS-CoV-2 ile enfekte olabilecekleri şaşırtıcı değildir. Çünkü kedilerdeki ACE-2 reseptörü ile insan ACE-2 reseptörü yüksek homolojiye sahiptir. SARS salgınında 2003 yılında (SARS-CoV-1) 'da etken ACE-2 reseptörünü kullanarak hücrelere girdiği için, kedilerin SARS-CoV-1 ile deneysel enfeksiyona duyarlı oldukları gösterilmiştir. Ayrıca 2003'teki

SARS salgını sırasında da kediler doğal olarak da enfekte olmuşlardır [8].

Son zamanlarda, kediler deneysel olarak intranazal yolla yüksek dozlarda SARS-CoV-2 etkeni ile inoküle edilmiş ve hayvanlarda klinik belirti görülmemiştir ancak nötralize edici antikolar ve dışkıda viral RNA tespit edilmiştir. Nekropside burunda, yumuşak damakta, bademciklerde, soluk borusunda ve akciğerlerde virüs bulunmuştur. Deneysel olarak enfekte edilen kedilerin hastalığı birlikte yaşadıkları duyarlı kedilere hava parçacıkları yoluyla bulaştırmışlardır. Virüs inokülasyonundan 24 gün sonra tüm kedilerde IgG antikoru (5, 120 ila 20,480 arasında değişen antikor titrelerde) belirlenmiştir. Klinik belirti olmadığı için bu çalışmada, araştırmacılar kedilerin SARS-CoV-2'nin sessiz bir ara konakçısı olabileceğini rapor etmişlerdir [35, 36, 37].

Tablo 2. Arkadaş hayvanlarda bildirilen doğal SARS-CoV-2 enfeksiyonları

Zaman	Türler	Lokasyon	Klinik	Örnek	Test	Pozitif/Toplam hayvan (%)	Kaynak
Şubat 2022	Köpek	Hong Kong/Çin	Yok	Oral ve fekal sürüntü serum	RT-qPCR PRN*	1/1 (100.0)	[19, 20]
Mart 2020	Köpek	Hong Kong/Çin	Yok	Nazal ve oral sürüntü, serum	RT-qPCR PRN	1/1 (100.0)	[21]
Mart-Nisan 2020	Kedi	Hong Kong/Çin	Yok	Nazal, oral, fekal sürüntü	RT-qPCR	1/17 (5.9)	[29, 30]
Mart 2020	Kedi	Belçika	Evet	Kusmuk, dışkı	RT-qPCR	1/1 (100.0)	[26, 27]
Nisan 2020	Kedi	Fransa	Evet	Rektal sürüntü	RT-qPCR, MIA**	1/22 (4.5)	[32]
Nisan 2020	Kedi	New York State/USA	Evet	Nazal sürüntü	RT-qPCR	2/2 (100.0)	[33,34]
Haziran 2020	Köpek	Hollanda	Evet	Serum	Serolojik test	1/1 (100.0)	[23]
Haziran 2020	Köpek	New York State, Richmond County/USA	Evet	Serum	Serolojik test	1/2 (50.0)	[24]
Haziran 2020	Kedi ve Köpek	Texas, USA	Yok	Respiratör, rektal ve tüylerden sürüntü	RT-qPCR	3/17 (17.6) 1/59 (1.7)	[25]
Ağustos 2020	Kedi	Hong Kong/Çin	Yok	Çeşitli sürüntü örnekleri	RT-qPCR	6/50 (12)	[31]
Ocak 2022	Hamster	Hong Kong/Çin	Yok	Çeşitli doku ve sürüntü serum	RT-qPCR, Serolojik test	17/28 (60.7)	[38]

*PRN, Plak Redüksiyon Nötralizasyon test, **MIA, Mikrosfer İmmunoassay

Hamsterlarda SARS-CoV-2 Enfeksiyonları

Hamsterler, SARS-CoV-2'ye karşı oldukça hassastır. Bu nedenle virüsü incelemek için popüler bir modeldir. Ancak, hamsterların laboratuvar dışında enfekte olabileceğini ve virüsü hem diğer hamsterlara hem de insanlara bulaştırabilecekleri ortaya çıkmıştır [38]. Kong'da, COVID-19'a karşı katı/sıfır tolerans ile mücadele sürerken, 23 yaşındaki bir evcil hayvan satış merkezi çalışanında 15 Ocak (2022) 'ta Delta varyantını belirlemişlerdir. Araştırmacılar bunun "biraz tuhaf" olduğunu, çünkü şehirde Delta varyantının insanlar arasında en son Ekim ayında belirlendiğini belirtmişlerdir. Evcil hayvan dükkanında 28 Suriye hamsterinin (*Mesocricetus auratus*) 15'inde SARS-CoV-2 viral RNA'sı veya virüse karşı antikorlar tespit edilirken aynı yerde bulunan diğer cüce hamster, tavşan, kobay, çinçilla veya farelerin hiçbirinde etken belirlenmemiştir. Araştırmacılar, kemirgenlerden alınan viral örneklerin genomik analizine göre, evcil hamsterlar muhtemelen SARS-CoV-2'nin Delta varyantını Hong Kong'a taşıdığı ve bir insan COVID-19 salgınına yol açtığı bildirmişlerdir [39, 40].

Danimarka ve Hollanda'daki insanlarda 2020 yılı sonlarında vizon yetiştirilen çiftlikteki vizonla bağlantılı küçük COVID-19 salgınları bildirilmiştir. Bu durum insanlarda paniğe neden olmuş ve toplu vizon itlafları yapılmıştır [41]. Hamsterler, vizondan sonra insanları enfekte edebildiği bilinen ikinci hayvan türüdür. Kanatlı hayvanlar ise SARS-CoV-2'ye duyarlı değildirler [42].

SONUÇ VE TARTIŞMA

SARS-CoV-2'nin kökeni ve bulaşması ile birlikte arkadaş hayvanların ve diğer hayvanların hastalığın bulaşmasındaki potansiyel rolü değerlendirilmektedir. Kedi ve köpek gibi refakatçi hayvanlar, SARS-CoV-2'ye duyarlıdır. İnsanlar bu hayvanlar için enfeksiyon kaynağı olabilir, ancak arkadaş hayvanların insanlara hastalık bulaşmasındaki potansiyel rolü tam olarak bilinmemektedir [43].

Hamster, Afrika yeşil maymunları, al yanaklı makakları, rakunlar, vizon, yaban gelinciği, kaplan ve aslan gibi diğer hayvanlar da bu enfeksiyona duyarlıdırlar [43,44]. Hatta bu duyarlı hayvanlardan hamsterler, Afrika yeşil maymunları, al yanaklı makaklar ve yaban gelinciği potansiyel hayvan modelleridir. Hayvanlar ve insanlar arasında ACE-2 hücre reseptörü benzerliği göz önüne alındığında, virüs için hayvanlardan insanlara ve insanlardan hayvanlara geçişin mümkün olabileceği öngörülmektedir. Bu nedenle, hayvan-hayvan, insandan hayvana ve hayvandan insana hastalık bulaşmasını önlemek için gerekli tedbirler dikkate alınmalı ve uygulanmalıdır [44].

SARS-CoV-2 hayvanlar arasında bulaşmaya devam edebilir, beklenmedik şekillerde evrimleşebilir ve daha sonra insanlara geri dönebilir. Bu nedenle, evcil hayvan ticaretinin yakından izlenmesinin önemli olduğu, yapılan son çalışmalar ve salgınla ortaya konmuştur.

Özellikle COVID-19 için yüksek riske sahip yaşlılar, evcil hayvanları için daha sıkı hijyen

önlemleri almalıdır. SARS-CoV-2 enfekte hayvan sahipleri evcil hayvanlarıyla yakın temastan kaçınmalıdır. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) tavsiyelerine göre; özellikle yaşlılar hayvanlarının başkalarıyla temasa girmesine (ev dışından insanlar veya diğer evcil hayvanlar) izin vermemeliler ve kedilerini içeride tutmalıdırlar. Köpeklerde, diğer insanlardan ve hayvanlardan en az 2 m uzakta tutularak tasmalı olarak gezdirilmelidir [45].

Tek Sağlık, insanlar, hayvanlar ve çevrenin optimal sağlığına ulaşmak ve sürdürmek için birden fazla multidisipliner araştırmacının ortak çabalarını temsil eder. Zoonozların kontrolü (Grip, kuduz ve Rift Valley Fever gibi hayvanlar ve insanlar arasında yayılabilen hastalıklar) Tek Sağlık yaklaşımının özellikle ilgili olduğu çalışma alanları arasında yer almaktadır. Koronavirüsler; kediler, köpekler, fareler, sıçanlar, sığırlar ve yarasalar gibi hayvanları ve insanları enfekte edebilmektedir. İnsanlar ve hayvanlar arasındaki yakın ilişki düşünüldüğünde insanlardan hayvanlara ve hayvanlardan da insanlara bulaş mekanizmalarının tek sağlık kavramı ile multidisipliner araştırılması gerekmektedir. Böylece son yirmi yılda ortaya çıkan yeni zoonoz etkenlerin (örneğin CoV-2) insanlara bulaşması ve insanlar arasında da yayılarak salgınlar oluşturmasını engellemek için daha etkili stratejilerin geliştirilebileceği düşünülmektedir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: N.Ü.; Tasarım: N.Ü.; Denetim: N.Ü.; Kaynaklar: N.Ü.; Veri Toplama ve/veya işleme: N.Ü.; Analiz ve/veya yorumlama: N.Ü.; Literatür taraması: N.Ü.; Makalenin yazılması: N.Ü.; Kritik inceleme: N.Ü.; Diğer.-

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Wevers, B. A., van der Hoek, L. (2009). Recently discovered human coronaviruses. *Clinics in Laboratory Medicine*, 29(4), 715–724. [\[CrossRef\]](#)
2. Li, H., Liu, S. M., Yu, X. H., Tang, S. L., Tang, C. K. (2020). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): current status and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(5), 10595. [\[CrossRef\]](#)
3. Masters, P.S., Perlman, S. Coronaviridae, Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Field Virology* 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 825, (2013).

4. Jin, Y., Yang, H., Ji, W., Wu, W., Chen, S., Zhang, W., Duan, G. (2020). Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of Covid-19. *Viruses*, 12(4), 372. [\[CrossRef\]](#)
5. Drzewnioková, P., Festa, F., Panzarin, V., Lelli, D., Moreno, A., Zecchin, B., De Benedictis, P., Leopardi, S. (2021). Best Molecular Tools to Investigate Coronavirus Diversity in Mammals: A Comparison. *Viruses*, 13(10), 1975. [\[CrossRef\]](#)
6. Haake, C., Cook, S., Pusterla, N., Murphy, B. (2020). Coronavirus Infections in Companion Animals: Virology, Epidemiology, Clinical and Pathologic Features. *Viruses*, 12(9), 1023. [\[CrossRef\]](#)
7. Hosie, M. J., Hofmann-Lehmann, R., Hartmann, K., Egberink, H., Truyen, U., Addie, D. D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Frymus, T., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M. G., Tasker, S., Thiry, E., Möstl, K. (2021). Anthropogenic Infection of Cats during the 2020 COVID-19 Pandemic. *Viruses*, 13(2), 185. [\[CrossRef\]](#)
8. Stout, A. E., André, N. M., Jaimes, J. A., Millet, J. K., Whittaker, G. R. (2020). Coronaviruses in cats and other companion animals: Where does SARS-CoV-2/COVID-19 fit?. *Veterinary Microbiology*, 247, 108777. [\[CrossRef\]](#)
9. Murphy F. A., Gibbs E. P. J., Horzinek M. C., Studdert M. J., Coronaviridae, *Veterinary Virology Third Edition*, Academic Press An Imprint of Elsevier, San Diego, California, 495-508, (1999).
10. Paim, F. C., Bowman, A. S., Miller, L., Feehan, B. J., Marthaler, D., Saif, L. J., Vlasova, A. N. (2019). Epidemiology of Deltacoronaviruses (δ -CoV) and Gammacoronaviruses (γ -CoV) in Wild Birds in the United States. *Viruses*, 11(10), 897. [\[CrossRef\]](#)
11. Lednicky, J.A., Tagliamonte, M.S., White, S.K., Elbadry, M.A., Alam, M., Stephenson, J.C., Barry, T.S., Loeb, J.C., Telismo, T., Chavannes, S., Ostro, D.A., Mavian, C., Beau De Rachars, V.M., Salemi, M., Morris Jr., J.G. (2021). Independent infections of porcine deltacoronavirus among Haitian children. *Nature*, 600, 133–137 [\[CrossRef\]](#)
12. Kong, F., Wang, Q., Kenney, S. P., Jung, K., Vlasova, A. N., Saif, L. J. (2022). Porcine Deltacoronaviruses: Origin, Evolution, Cross-Species Transmission and Zoonotic Potential. *Pathogens*, 11(1), 79. [\[CrossRef\]](#)
13. Lam, T.T.Y., Jia, N., Zhang, Y.W., Shum, M.H.H., Jiang, J., Zhu, H., Tong, G., Shi, Y., Ni, X., Liao, Y., Li, W., Jiang, B., Wei, W., Yuan, T., Zheng, K., Cui, X., Li, J., Pei, G., Qiang, X., Cheung, W., Li, L., Sun, F., Qin, S., Huang, J., Leung, G.M., Holmes, E.C., Hu, Y., Guan, Y., Cao, W. (2020). Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*, 583, 282–285 [\[CrossRef\]](#)
14. Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., Chen, J., Meng, Y., Wang, J., Lin, Y., Yuan, Y., Xie, Z., Ma, J., Liu, W.J., Wang, D., Xu, W., Holmes, E.C., Gao, G.F., Wu, G., Chen, W., Shi, W., Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet (London, England)*, 395(10224), 565–574. [\[CrossRef\]](#)
15. Shang, J., Ye, G., Shi, K., Wan, Y., Luo, C., Aihara, H., Geng, Q., Auerbach, A., Li, F. (2020). Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*, 581(7807), 221–224. [\[CrossRef\]](#)

16. Hu, B., Guo, H., Zhou, P., Shi, Z. L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews. Microbiology*, 19(3), 141–154. [CrossRef]
17. Xia, X. (2020). Extreme genomic CpG deficiency in SARS-CoV-2 and evasion of host antiviral defense. *Molecular Biology and Evolution*, 37(9), 2699-2705. [CrossRef]
18. Hossain, M. G., Javed, A., Akter, S., Saha, S. (2021). SARS-CoV-2 host diversity: An update of natural infections and experimental evidence. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei mian yu gan ran za zhi*, 54(2), 175–181. [CrossRef]
19. SARS-CoV-2 Positive Test Results in Dogs in Hong Kong: Follow-Up Report No.1, OIE (World Organization for Animal Health) Web site. (2020a). Retrieved March 9, 2020, from https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=33546. Erişim tarihi: 24.04.2020.
20. SARS-CoV-2 Positive Test Results in Dogs in Hong Kong: Follow-Up Report No. 3, OIE (World Organization for Animal Health) Web site. (2020b). Retrieved March 28, 2020, from https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?reportid=33762. Erişim tarihi: 24.04.2020.
21. Follow-Up Report NO1 (Second HK Dog, Final Report, OIE (World Organization for Animal Health) Web site. (2020c). Retrieved April 7, 2020, from https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=33892. Erişim tarihi: 24.04.2020.
22. de Morais, H.A., dos Santos, A.P., do Nascimento, N.C., Kmetiuk, L.B., Barbosa, D.S., Brandão, P.E., Guimarães, A.M.S., Pettan-Brewer, C., Biondo, A.W. (2020) Natural Infection by SARS-CoV-2 in Companion Animals: A Review of Case Reports and Current Evidence of Their Role in the Epidemiology of COVID-19, *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 591216. [CrossRef]
23. Dutch house pets test positive for coronavirus, DW Web site. Retrived March 24, 2022, from <https://www.dw.com/en/dutch-house-pets-test-positive-for-coronavirus/a-53460111>. Erişim tarihi: 24.03.2022.
24. AVMA (American Veterinary Medical Association) Web site.(2020b). Retrieved March 24, 2020, from <https://www.avma.org/resources-tools/animal-health-and-welfare/covid-19/sars-cov-2-animals-including-pets>. Erişim tarihi: 24.04.2020
25. Hamer, S. A., Pauvolid-Corrêa, A., Zecca, I. B., Davila, E., Auckland, L. D., Roundy, C. M., Tang, W., Torchetti, M. K., Killian, M. L., Jenkins-Moore, M., Mazingo, K., Akpalu, Y., Ghai, R. R., Spengler, J. R., Barton Behravesh, C., Fischer, R., Hamer, G. L. (2021). SARS-CoV-2 Infections and Viral Isolations among Serially Tested Cats and Dogs in Households with Infected Owners in Texas, USA. *Viruses*, 13(5), 938. [CrossRef]
26. Garigliany, M., Van Laere, A. S., Clercx, C., Giet, D., Escriou, N., Huon, C., van der Werf, S., Eloit, M., Desmecht, D. (2020). SARS-CoV-2 Natural Transmission from Human to Cat, Belgium, March 2020. *Emerging Infectious Diseases*, 26(12), 3069–3071. [CrossRef]
27. Information Provided by the National Veterinary Services of Belgium, OIE (World Organization for Animal Health) Web site. (2020e). Retrieved March 28, 2020, from https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/COV-19/Belgium_28.03.20.pdf. Erişim tarihi: 24.04.2020.

28. Pet cat tests positive for COVID-19 virus. The Government of the Hong Kong Special Administrative Region Web site. Retrieved March, 31, 2020, from <https://www.info.gov.hk/gia/general/202003/31/P2020033100717.htm> . Erişim tarihi: 24.04.2020.
29. AVMA (American Veterinary Medical Association) Web site. (2020a) Retrieved March 24, 2020, from <https://www.avma.org/resources-tools/animal-health-and-welfare/covid-19/sars-cov-2-animals-including-pets>. Erişim tarihi: 24.04.2020.
30. Immediate Notification, OIE (World Organization for Animal Health) Web site. (2020d). Erişim tarihi: 24.04.2020.
31. Barrs, V. R., Peiris, M., Tam, K., Law, P., Brackman, C. J., To, E., Yu, V., Chu, D., Perera, R., Sit, T. (2020). SARS-CoV-2 in Quarantined Domestic Cats from COVID-19 Households or Close Contacts, Hong Kong, China. *Emerging Infectious Diseases*, 26(12), 3071–3074. [CrossRef]
32. Sailleau, C., Dumarest, M., Vanhomwegen, J., Delaplace, M., Caro, V., Kwasiborski, A., Hourdel, V., Chevaillier, P., Barbarino, A., Comtet, L., Pourquier, P., Klonjowski, B., Manuguerra, J. C., Zientara, S., & Le Poder, S. (2020). First detection and genome sequencing of SARS-CoV-2 in an infected cat in France. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(6), 2324–2328 [CrossRef]
33. Confirmation of COVID-19 in Two Pet Cats in New York (2020). USAID (United States Agency for International Development) Web site. Retrieved April 22, 2020, from <https://www.cdc.gov/media/releases/2020/s0422-covid-19-cats-NYC.html>. Erişim tarihi: 24.03.2022.
34. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) Web site. Retrieved April 22, 2020, from <https://www.cdc.gov/media/releases/2020/s0422-covid-19-cats-NYC.html>. Erişim tarihi: 24.03.2022.
35. SARS-CoV-2 in animals, American Veterinary Medical Association Web site. Retrieved April 24, 2020, from <https://www.avma.org/resources-tools/animalhealth-and-welfare/covid-19/sars-cov-2-animals-includingpets>. Erişim tarihi: 24.04.2020.
36. Halfmann, P. J., Hatta, M., Chiba, S., Maemura, T., Fan, S., Takeda, M., Kinoshita, N., Hattori, S. I., Sakai-Tagawa, Y., Iwatsuki-Horimoto, K., Imai, M., Kawaoka, Y. (2020). Transmission of SARS-CoV-2 in Domestic Cats. *The New England Journal of Medicine*, 383(6), 592–594. [CrossRef]
37. Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., Liu, R., He, X., Shuai, L., Sun, Z., Zhao, Y., Liu, P., Liang, L., Cui, P., Wang, J., Zhang, X., Guan, Y., Tan, W., Wu, G., Chen, H., Bu, Z. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science (New York, N.Y.)*, 368(6494), 1016–1020. [CrossRef]
38. Mallapaty S. (2022). How sneezing hamsters sparked a COVID outbreak in Hong Kong. *Nature*, 10.1038/d41586-022-00322-0. Advance online publication. [CrossRef]
39. Yen, H.L, Sit, T.H.C., Brackman, C.J., Chuk, S.S.Y., Gu, H., Tam, K.W.S., Law, P.Y.T., Leung, G.M., Peiris M., Poon L.L.M., the HKU-SPH study team (2022). Transmission of SARS-CoV-2 delta variant (AY.127) from pet hamsters to humans, leading to onward human-to-human transmission: a case study. *Lancet*, 399, 1070–1078. [CrossRef]

40. Kok, K. H., Wong, S. C., Chan, W. M., Wen, L., Chu, A. W., Ip, J. D., Lee, L. K., Wong, I. T., Lo, H. W., Cheng, V. C., Ho, A. Y., Lam, B. H., Tse, H., Lung, D., Ng, K., Au, A. K., Siu, G. K., Yuen, K. Y. (2022). Co-circulation of two SARS-CoV-2 variant strains within imported pet hamsters in Hong Kong. *Emerging Microbes & Infections*, 11(1), 689–698. [\[CrossRef\]](#)
41. Boklund, A., 1, Hammer, A. S., Quaade, M. L., Rasmussen, T. B., Lohse, L., Strandbygaard, B., Jørgensen C. S., Olesen, A. S., Hjerpe F. B., Petersen, H. H., Jensen, T. K., Mortensen, S., Calvo-Artavia F. F., Lefèvre S. K., Nielsen S. S., Halasa, T., Belsham G. J., Bøtner, A. (2021) SARS-CoV-2 in Danish Mink Farms: Course of the Epidemic and a Descriptive Analysis of the Outbreaks in 2020. *Animals*, 11, 164. [\[CrossRef\]](#)
42. Hafez, H. M., Attia, Y. A., Bovera, F. Abd El-Hack, M.E., Khafaga, A.F., de Oliveira, M.C. (2021). Influence of COVID-19 on the poultry production and environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 44833–44844. [\[CrossRef\]](#)
43. Murphy, H. L., Ly, H. (2021). Understanding the prevalence of SARS-CoV-2 (COVID-19) exposure in companion, captive, wild, and farmed animals, *Virulence*, 12(1), 2777-2786. [\[CrossRef\]](#)
44. Kiros, M., Andualem, H., Kiros, T., Hailemichael, W., Getu, S., Geteneh, A., Alemu, D., Abegaz, W.E. (2020). COVID-19 pandemic: current knowledge about the role of pets and other animals in disease transmission, *Virology Journal*, 17, 143. [\[CrossRef\]](#)
45. Csiszar, A., Jakab, F., Valencak, T. G., Lanszki, Z., Tóth, G. E., Kemenesi, G., Tarantini, S., Fazekas-Pongor, V., Ungvari, Z. (2020). Companion animals likely do not spread COVID-19 but may get infected themselves. *GeroScience*, 42(5), 1229–1236. [\[CrossRef\]](#)

Yayın Koşulları

1. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi (Ankara Ecz. Fak. Derg. – J. Fac. Pharm. Ankara) yılda üç kez (Ocak-Mayıs-Eylül) yayımlanır.
2. Dergiye Eczacılığın her alanında daha önce hiç bir yerde yayınlanmamış, Türkçe veya yabancı dilde (İngilizce, Fransızca, İspanyolca ve Almanca) olarak hazırlanmış makaleler kabul edilir. Deneylerde, insan için “the Declaration of Helsinki” ve hayvan için “European Community Guidelines”’a bağlı kalınmalıdır.
3. Yayın Komisyonuna gelen makaleler en az 2 danışmana gönderilir.
4. Makaleler yayına kabul ediliş sırasına göre yayımlanır.
5. Danışmanlar tarafından önerilen düzeltmelerin yapılması için yazar/ yazarlara geri gönderilen makaleler, düzeltilip yayınlanmak üzere 3 ay içinde tekrar yayın kuruluna gönderilmezse, yeni başvuru olarak işlem görür. Makale yayımlandıktan önce yazarların yayımcıya makalenin “Copyright Transfer Form”unu doldurarak telif hakkını göndermesi gerekmektedir.
6. 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. Türlerine 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

- Yasin DARI, Süleyman YUR, Gülmira ÖZEK, Ülkü Dilek UYSAL - **BIOLOGICAL ACTIVITY DETERMINATION OF BLACK AND WHITE CHIA SEED EXTRACTS OBTAINED BY DIFFERENT EXTRACTION METHODS** - SİYAH VE BEYAZ CHIA TOHUMLARININ FARKLI YÖNTEMLERLE ELDE EDİLEN EKSTRELERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTE TAYİNİ **277**
- Samia HAJJAR, Ali JABER, Milad EL RIACHI, Fadi ABDEL SATER, Edmond CHEBLE - **GC-MS ANALYSIS OF ESSENTIAL OIL AND ANTICANCER ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM DISCARDED LEAVES OF NICOTIANA TABACUM LINN.** - KULLANILMAYAN *NICOTIANA TABACUM* LINN. YAPRAKLARINDAN ELDE EDİLEN UÇUCU YAĞIN GC-MS ANALİZİ VE EKSTRENİN ANTİKANSER AKTİVİTESİ **291**
- Andrey GOTSULYA, Yevhen ZAIKA, Tetiana BRYTANOVA - **SYNTHESIS, PROPERTIES AND BIOLOGICAL POTENTIAL SOME CONDENSED DERIVATIVES 1,2,4-TRIAZOLE** - BAZI 1,2,4-TRİAZOL YOĞUNLAŞTIRILMIŞ TÜREVLERİNİN SENTEZİ, ÖZELLİKLERİ VE BİYOLOJİK POTANSİYELİ **308**
- Merve Eylül KIYMACI - **INTERACTION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS WITH SOLID LIPID NANOPARTICLES** - *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*'UN KATI LİPİD NANOPARTİKÜLLER İLE ETKİLEŞİMİ **322**
- Andrii SAFONOV, Denys DEMIANENKO, Yevheniia VASHCHYK, Yuliia LARIANOVSKA, Dmytro LYTKIN, Roman SHCHERBYNA, Anna OCHERETNIUK, Svitlana ROMANOVA - **HISTOLOGICAL STUDY OF A CORRECTIVE INFLUENCE OF SODIUM 2-((4-AMINO-5-(THIOPHEN-2-YLMETHYL)-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-YL) THIO) ACETATE ON THE STATE OF RATS LIVER UNDER CONDITIONS OF ACUTE IMMOBILIZATION STRESS** - AKUT HAREKETSİZLİK STRES KOŞULLARINDA SODYUM 2-((4-AMİNO-5-(TİYOFEN-2-İLMETİL)-4H-1,2,4-TRİAZOL-3-İL) TİYO) ASETAT'IN SIÇAN KARACİĞERİNİN DURUMU ÜZERİNDEKİ DÜZELTİCİ ETKİSİNİN HİSTOLOJİK ÇALIŞMASI **330**
- Mert İLHAN, Muhammed Mesud HÜRKUL - **LEAF ANATOMY OF INULA PEACOCKIANA (AITCH. & HEMSL.) KOROVIN** - *INULA PEACOCKIANA* (AITCH. & HEMSL.) KOROVIN'NİN YAPRAK ANATOMİSİ **342**
- Gizem Rüya TOPAL, Merve Eylül KIYMACI, Yalçın ÖZKAN - **PREPARATION AND IN VITRO CHARACTERIZATION OF VANCOMYCIN LOADED PLGA NANOPARTICLES FOR THE TREATMENT OF ENTEROCOCCUS FAECALIS INFECTIONS** - ENTEROKOK ENFEKSİYONLARINDA KULLANILMAK ÜZERE VANCOMİSİN İÇEREN PLGA NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE **350**

KARAKTERİZASYONU

- Nilay AKSOY, Nur OZTURK, Serel ULUSOY, Rashida Muhammad UMAR, Sena ÖZAYDIN - **EVALUATION OF EDUCATIONAL NEEDS OF DIABETIC PATIENTS** - DİYABETİK HASTALARIN EĞİTİM İHTİYAÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ 364
- İsmail ÇELİK, Meryem EROL, Ebru UZUNHİSARCIKLİ, Ufuk İNCE - **VIRTUAL SCREENING AND MOLECULAR DOCKING ANALYSIS ON THREE SARS-COV-2 DRUG TARGETS BY MULTIPLE COMPUTATIONAL APPROACH** - ÇOKLU HESAPLAMALI YAKLAŞIMLA ÜÇ SARS-COV-2 İLAÇ HEDEFLERİ ÜZERİNDE SANAL TARAMA VE MOLEKÜLER DOKİNG ANALİZİ 376
- Hande YÜCE, Neşe Başak TÜRKMEN, Selinay ŞENKAL, Dilan Aşkın ÖZEK, Ezgi BULUT, Ayşegül DOĞAN, Songül ÜNÜVAR - **PATULİNİN KARACİĞER VE AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ İN VİTRO ANTİTÜMÖR AKTİVİTESİ** - IN VITRO ANTITUMOR ACTIVITY OF PATULIN ON LİVER AND LUNG CANCER CELL LINES 393
- Hayrettin SEÇİLMİŞ, Ebru ÇUBUK DEMİRALAY, Kader POTURCU - **DETERMINATION OF CHROMATOGRAPHIC PROTONATION CONSTANTS OF SOME IMIDAZOLE ANTIMYCOTIC DRUGS IN ACETONITRILE-WATER BINARY MIXTURES** - ASETONİTRİL-SU İKİLİ KARIŞIMLARINDA BAZI İMİDAZOL ANTİMİKOTİK İLAÇLARIN KROMATOĞRAFİK PROTONASYON SABİTLERİNİN BELİRLENMESİ 405
- Ece MISER-SALİHOĞLU, Bolkan SIMSEK, Erdoğan ÇAYIR, Sevgi AKAYDIN - **COMPARISON OF THE PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN PEPPERMINT PLANT ACCORDING TO THE DRYING METHOD** - KURUTMA YÖNTEMİNE GÖRE NANE BİTKİSİNİN FENOLİK İÇERİĞİNİN VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN KARŞILAŞTIRILMASI 418
- Merve İNCİ ÇAMÇI, Meral ERDİNÇ, Emre UYAR, İlker KELLE - **DENEYSEL DİYABETİN NEDEN OLDUĞU DEPRESYON TEDAVİSİNDE MİNOSİKLİN VE MİNOSİKLİN+METFORMİN KULLANIMI** - EFFECT OF MINOCYCLINE AND MINOSCYCLINE+METFORMIN ON EXPERIMENTAL DIABETES-RELATED DEPRESSION 432
- Kenan Can TOK, Şeyda YAYLA - **GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY (GC-MS) ANALYSIS OF CONSOLIDA THIRKEANA EXTRACT** - CONSOLIDA THIRKEANA EKSTRESİNİN GAZ KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE SPEKTROMETRESİ (GC-MS) ANALİZİ 444
- Merve Eylül KIYMACI, Duygu SIMSEK, Nurten ALTANLAR - **MOLECULAR IDENTIFICATION AND LIPOLYTIC ACTIVITY OF YARROWIA LIPOLYTICA ISOLATED FROM YOGHURT CREAM** - YOĞURT KAYMAĞINDAN İZOLE EDİLEN YARROWIA LIPOLYTICA'NIN MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU VE LİPOLİTİK AKTİVİTESİ 450
- Gözde YALCIN OZKAT, Birsen HUYLU - **DEVELOPMENT OF NEW CYCLOPHILIN D RECEPTOR INHIBITORS FOR THE TREATMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS** - MS HASTALIĞININ TEDAVİSİ İÇİN YENİ SİKLOFİLİN D RESEPTÖR İNHİBİTÖRLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ 458
- Fuat KARAKUŞ, Burak KUZU - **POSSIBLE CARDIOPROTECTIVE MECHANISM OF ACTION OF DEXRAZOXANE, AND PROBABLE HUMAN TOPOISOMERASE IIβ INHIBITORS: AN IN SILICO ANALYSIS** - DEKSRAZOKSANIN OLASI KARDİYOPROTEKTİF ETKİ MEKANİZMASI VE MUHTEMEL İNSAN TOPOİZOMERAZ IIB 474

İNHİBİTÖRLERİ: *İN SİLİCO* ANALİZ

Derlemeler / Reviews

- Burçin MERSİN, Gülçin SALTAN İŞCAN - **MORINGA OLEIFERA**'NİN ETKİNLİK VE GÜVENLİĞİ - SAFETY AND EFFICACY OF *MORINGA OLEIFERA* 487
- Tuğçe İNCE KÖSE, Ayşe Mine GENÇLER ÖZKAN - **ANTİVİRAL ETKİLİ BİTKİLER** - ANTIVIRAL HERBS 505
- Ahmet Hüsamettin BARAN - **ANTİPARKİNSON İLAÇLARINA VERİLEN BİREYSEL YANITTA FARMAKOGENETİĞİN ROLÜ** - THE ROLE OF PHARMACOGENETICS IN INDIVIDUAL RESPONSE TO ANTIPARKINSONIAN DRUGS 523
- Songül TEZCAN - **MANAGEMENT OF DRUG INTERACTIONS IN COLON CANCER PATIENTS** - KOLON KANSERİ HASTALARINDA İLAÇ ETKİLEŞİMLERİNİN YÖNETİMİ 537
- Ezgi AYDIN, Ali AYDIN, Gizem ÇETİNER, Gülşah EREL-AKBABA - **DOĞADAN İLHAM ALAN BİYOMİMETİK NANOTAŞIYICI SİSTEMLER** - NATURE-INSPIRED BIOMIMETIC NANOCARRIER SYSTEMS 551
- Sultan PEKACAR, Didem DELİORMAN ORHAN - **PISTACIA LENTISCUS L. TÜRÜNÜN BOTANİK, ETNOFARMAKOLOJİK, FİTOKİMYASAL VE FARMAKOLOJİK AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ** - EVALUATION OF BOTANICAL, ETHNOPHARMACOLOGICAL, PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF *PISTACIA LENTISCUS L. SPECIES* 576
- Jale AKGÖL, Ayşegül KÖROĞLU - **UYUZ HASTALIĞI (SKABİYES), TEDAVİSİ VE UYUZ HASTALIĞI TEDAVİSİNDE KULLANILAN BİTKİLER** - SCABIES, SCABIES TREATMENT AND PLANTS USED IN THE TREATMENT OF SCABIES 600
- Gözde YENİCE ÇAKMAK, Ahmet Özer ŞEHİRLİ - **TREATMENT OF BEHÇET'S DISEASE AND CURRENT APPROACHES** - BEHÇET HASTALIĞININ TEDAVİSİ VE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR 619
- Nilgün ÜNAL - **COVID-19 YAYILMASINDA ARKADAŞ HAYVANLARIN ROLÜ** - THE ROLE OF COMPANION ANIMALS IN SPREADING COVID-19 651