

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



**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**  
**ECZACILIK FAKÜLTESİ**  
**DERGİSİ**

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

**Cilt / Vol : 47**  
**Sayı / No : 1**  
**Yıl / Year : 2023**

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



**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**  
**ECZACILIK FAKÜLTESİ**  
**DERGİSİ**

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

**Cilt / Vol: 47**  
**Sayı / No: 1**  
**Yıl / Year: 2023**

---

**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. M. Mesud HÜRKUL**

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı*

*e-posta: mhurkul@ankara.edu.tr*

**Dr. Öğr. Üyesi Aysu SELÇUK**

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Klinik Eczacılık Anabilim Dalı*

*e-posta: aysuselcuk@ankara.edu.tr*

**Dr. Fatma DOĞANÇ**

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı*

*e-posta: doganc@ankara.edu.tr*

**Alan Editörleri:**

**Doç. Dr. İlker ATEŞ**

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

**Doç. Dr. Özgür ÜSTÜNDAĞ**

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

**Doç. Dr. Ceyda Tuba ŞENGEL TÜRK**

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

**Doç. Dr. Işıl ÖZAKÇA GÜNDÜZ**

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

**Doç. Dr. Banu KAŞKATEPE**

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

**Doç. Dr. Zühal KILIÇ KURT**

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

**Doç. Dr. Ash 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. Öğr. Üyesi Derya ÇİÇEK POLAT**

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

**Öğr. Gör. Muammer ÇALIKUŞU**

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

**Dr. Berna GÜVEN**

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

**Dr. Sezen YILMAZ SARIALTIN**

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

**Dr. Aybüke ÇELİK**

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

**Araş. Gör. Tuğrul Mert SERİM**

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

**Araş. Gör. Sevgi TEKTAŞ**

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı  
e-posta: stektas@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 ÖZCELİKAY *Ankara Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*  
Prof. Dr. Gülçin Hayriye SALTAN İŞCAN *Ankara Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*  
Prof. Dr. Gülgün AYHAN KILCIGİL *Ankara Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*  
Prof. Dr. Istvan TOTH *Queensland Üniversitesi, AVUSTRALYA*  
Prof. Dr. Ivan KOSALEC *Zagreb Üniversitesi, Zagreb, HIRVATİSTAN*  
Prof. Dr. İlkay KÜÇÜKGÜZEL *Marmara Üniversitesi, İstanbul, TÜRKİYE*  
Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ *Hacettepe Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*  
Prof. Dr. Lütfiye Ömür DEMİREZER *Hacettepe Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*  
Prof. Dr. Milan STEFEK *Slovak Bilim Akademisi, Bratislava, SLOVAK CUMHURİYETİ*  
Prof. Dr. Mine HOŞGÖR LİMONCU *Ege Üniversitesi, İzmir, TÜRKİYE*  
Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL *Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, TÜRKİYE*  
Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL *Ankara Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*  
Prof. Dr. Nina CHANISHVILI *George Eliava Bak., Mik. ve Vir. Enstitüsü, Tiflis, GÜRCİSTAN*  
Prof. Dr. Nurten ALTANLAR *Ankara Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE*  
Prof. Dr. Rudolf BAUER *Graz Üniversitesi, Graz, AVUSTURYA*  
Prof. Dr. Selen 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. İlkey 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. M. Mesud HÜRKÜL**

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany*

*e-mail: mhurkul@ankara.edu.tr*

**Assist. Prof. Dr. Aysu SELÇUK**

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Clinical Pharmacy*

*e-mail: aysuselcuk@ankara.edu.tr*

**Dr. Fatma DOĞANÇ**

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry*

*e-mail: doganc@ankara.edu.tr*

**Section Editors:**

**Assoc. Prof. Dr. İlker ATEŞ**

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Toxicology*

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

**Assoc. Prof. Dr. Özgür ÜSTÜNDAĞ**

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry*

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

**Assoc. Prof. Dr. Ceyda Tuba ŞENGEL TÜRK**

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology*

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

**Assoc. Prof. Dr. Işıl ÖZAKÇA GÜNDÜZ**

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology*

*e-posta: ozakca@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. Zühal KILIÇ KURT**

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry*

*e-mail: zkurt@ankara.edu.tr*

**Assoc. Prof. Dr. Ash KOÇ**

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry*

*e-mail: akoc@ankara.edu.tr*

**Assist. Prof. Dr. Burçin ERGENE**

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy*

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

**Assist. Prof. Dr. Derya ÇİÇEK POLAT**

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany*

*e-mail: polatd@ankara.edu.tr*

**Lec. Muammer ÇALIKUŞU**

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

*e-mail: calikusu@ankara.edu.tr*

**Dr. Berna GÜVEN**

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology*

*e-mail: bguven@ankara.edu.tr*

**Dr. Sezen YILMAZ SARIALTIN**

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Toxicology*

*e-mail: sznyilmaz@ankara.edu.tr*

**Dr. Aybüke ÇELİK**

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry*

*e-mail: aybukecelik@ankara.edu.tr*

**Res. Assist. Tuğrul Mert SERİM**

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology*

*e-mail: serim@pharmacy.ankara.edu.tr*

**Res. Assist. Sevgi TEKTAŞ**

*Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology*

*e-mail: stektas@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. Gülbın ÖZCELİKAY *Ankara University, Ankara, TURKEY*  
Prof. Dr. Gülçın 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 Ayşıl 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 47(1), 2023

## Özgün Makaleler / Original Articles

Sayfa / Page

- Duygu BAYRAMOĞLU, Merve DEMİRBÜĞEN ÖZ, Merve Eylül KIYMACI - **THE COMPARISON OF ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF NOVEL PYRIMIDO[1,2-a]PYRIMIDINE COMPOUNDS** - *YENİ PİRİMİDO[1,2-a]PİRİMİDİN BİLEŞİKLERİNİN ANTİOKSİDAN VE ANTİBAKTERİYAL ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI* 1
- Meliha GÜNEŞ, Gökçe TURAN, Armağan DÖNMEZER, Fadime AYDIN KÖSE, Özgen ÖZER, Sinem Yaprak KARAVANA - **MUCOADHESIVE ORODISPERSIBLE FILM FORMULATIONS OF RASAGILINE MESYLATE FOR PARKINSON TREATMENT** - *PARKİNSON TEDAVİSİ İÇİN RASAJİLİN MESİLAT MUKOADEZİF AĞIZDA DAĞILAN FİLM FORMÜLASYONLARI* 9
- Nazlı TURAN YÜCEL, Ümmühan KANDEMİR, Umut İrfan ÜÇEL, Özgür Devrim CAN, Ümide DEMİR ÖZKAY - **REBOXETİN'İN DİYABETİK SIÇANLARDA BOZULMUŞ DAVRANIŞ PARAMETRELERİ ÜZERİNDEKİ YARARLI ETKİLERİ** - *BENEFICIAL EFFECTS OF REBOXETINE ON IMPAIRED BEHAVIORAL PARAMETERS OF DIABETIC RATS* 20
- Heybet Kerem POLAT, Sedat ÜNAL - **DEVELOPMENT OF BESIFLOXACIN HCL LOADED OCULAR IN SITU GELS; IN VITRO CHARACTERIZATION STUDY** - *BESİFLOKSASİN HCL YÜKLÜ OKÜLER İN SİTU JELLERİN GELİŞTİRİLMESİ; İN VİTRO KARAKTERİZASYON ÇALIŞMASI* 39
- Tugce DEMIROZ AKBULUT, Sura BAYKAN - **EGE BÖLGESİ'NDE YAYILIŞ GÖSTEREN MARRUBIUM L. (LAMIACEAE) TAKSONLARININ MORFOLOJİK VE MİKROMORFOLOJİK YÖNDE İNCELENMESİ** - *MORPHOLOGICAL AND MICROMORPHOLOGICAL INVESTIGATION OF MARRUBIUM L. (LAMIACEAE) TAXONS DISTRIBUTED IN THE AEGEAN REGION* 51
- Bilge SÖZEN ŞAHNE, Elif ULUTAŞ DENİZ, Leyla YUMRUKAYA, Melih ELÇİN, Selen YEĞENOĞLU - **MESLEKLER ARASI EĞİTİME GENÇ BAKIŞ: SİMÜLASYON UYGULAMASINA YÖNELİK ÖĞRENCİ GÖRÜŞLERİ** - *A YOUTH VIEW ON INTERPROFESSIONAL EDUCATION: STUDENT OPINIONS ON SIMULATION PRACTICES* 76
- Nuraniye ERUYGUR, Fatma AYAZ - **EXAMINATION OF THE AERIAL PARTS OF CLINOPODIUM PAMPHYLICUM SUBSP. DAVISII (CONTANDR. & QUÉZEL) GOVAERTS IN TERMS OF ANTIOXIDANT AND ENZYME INHIBITION POTENTIALS, TOGETHER WITH PHENOLIC PROFILE** - *CLINOPODIUM PAMPHYLICUM SUBSP. DAVISII (CONTANDR. & QUÉZEL) GOVAERTS TOPRAK ÜSTÜ KISIMLARININ ANTİOKSİDAN VE ENZİM İNHİBİSYON POTANSİYELİ VE FENOLİK PROFİLİNİN İNCELENMESİ* 86
- Hakan BALCI, Zehra Özden ERDOĞAN, Alperen ÖZDEMİR - **SİPROFLOKSASİN TAYİNİ İÇİN NANOPARTİKÜL TEMELLİ DUYARLI SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ** - *DEVELOPMENT OF NANOPARTICLE BASED SENSITIVE SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF CIPROFLOXACIN* 95
- Hilal Basak EROL, Banu KASKATEPE, Nurten ALTANLAR, Sulhiye YILDIZ, Suleyman YALCIN - **GENETIC DIVERSITY OF ACINETOBACTER BAUMANNII STRAINS ISOLATED FROM DIFFERENT HOSPITALS** - *FARKLI HASTANELERDEN İZOLE EDİLEN ACINETOBACTER BAUMANNII SUŞLARININ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİ* 104
- Tugce GUR MAZ, Sumeyye TURANLI, H. Burak CALISKAN - **DESIGN AND SYNTHESIS OF SOME ARYLHYDRAZONE DERIVATIVES AS POTENTIAL FAAH INHIBITORS** - *POTANSİYEL FAAH İNHİBİTÖRÜ OLARAK BAZI ARİLİDRAZON TÜREVİ BİLEŞİKLERİN TASARIMI VE SENTEZİ* 111
- Merve İNCİ ÇAMÇI, Meral ERDİNÇ, İlker KELLE, Emre UYAR, Levent ERDİNÇ - **THE EFFECTS OF MELATONIN, FLUOXETINE AND THEIR COMBINATIONS ON STRESS-INDUCED BEHAVIORAL AND COGNITIVE IMPAIRMENTS IN MICE** - *FARELERDE STRESİN NEDEN OLDUĞU DAVRANIŞSAL VE KOGNİTİF BOZUKLUKLARA MELATONİN, FLUOKSETİN VE KOMBİNASYONLARININ ETKİSİ* 120



Meliha EKİNCİ, Derya İLEM-ÖZDEMİR - <b>CELL INCORPORATION STUDY OF [<sup>99m</sup>Tc]Tc-NAB-PACLITAXEL ON HUMAN COLORECTAL ADENOCARCINOMA CELL LINE - [<sup>99m</sup>Tc]Tc-NAB-PAKLİTAKSEL'İN İNSAN KOLOREKTAL ADENOKARSİNOMA HÜCRE HATTI ÜZERİNDE HÜCRE BAĞLANMA ÇALIŞMASI</b>	133
Manish GOYANI, Meghraj SURYAWANSHI, Ridhdhesh JIVAWALA - <b>FORMULATION AND EVALUATION OF PARENTERAL IN-SITU FORMING BIODEGRADABLE IMPLANT FOR CONTROLLED RELEASE OF LEVOTHYROXINE SODIUM - LEVOTİROKSİN SODYUMUN KONTROLLÜ SALIMI İÇİN IN-SITU PARENTERAL BİYOBÖZÜNÜR İMPLANT FORMÜLASYONU VE DEĞERLENDİRİLMESİ</b>	141
Burçin ERGENE, Damla HADDUR, Melek KARAASLAN, Kamuran İLERİ ÖZLER, Gülçin SALTAN İŞCAN - <b>PİYASADA BULUNAN BAZI UÇUCU YAĞLARIN FARMAKOPE UYGUNLUĞUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ - EVALUATION OF PHARMACOPOEIA COMPLIANCE OF SOME ESSENTIAL OILS IN THE MARKET</b>	157
Eldrin DLR. ARGUELLES - <b>CHEMICAL COMPOSITION AND IN VITRO ANALYSIS OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ACUTODESMUS DIMORPHUS (TURPIN) P.M. TSARENKO (SCENEDESMACEAE, CHLOROPHYTA) - ACUTODESMUS DIMORPHUS (TURPIN) P.M. TSARENKO (SCENEDESMACEAE, CHLOROPHYTA)'NİN KİMYASAL BİLEŞİMİ VE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİNİN İN VİTRO ANALİZİ</b>	168
Fatma Tuğçe GÜRAĞAÇ DERELİ, Evren ARIN, Ebru ÖNEM - <b>EVALUATION OF THE POTENTIAL ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF BERBERIS CRATAEGINA DC.: BY FOCUSING ON QUORUM SENSING INHIBITION OF CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM ATCC 12472 - BERBERIS CRATAEGINA DC'NİN ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE POTANSİYELİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ: CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM ATCC 12472'DE ÇEVREYİ ALGILAMA SİSTEMİ İNHİBİSYONUNA ODAKLANARAK</b>	178
Derya DOĞANAY, Müzeyyen AYDIN, İbrahim Serkan AVŞAR - <b>FARKLI KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLMİŞ KLEBSIELLA PNEUMONIAE İZOLATLARININ ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLİNİN İNCELENMESİ: COVID-19 PANDEMİSİ SÜRECİNDEKİ BİR YILLIK VERİLER - INVESTIGATION OF THE ANTIBIOTIC RESISTANCE PROFILE OF KLEBSIELLA PNEUMONIAE ISOLATES ISOLATED FROM DIFFERENT CLINICAL SPECIMENS: ONE-YEAR DATA DURING THE COVID-19 PANDEMIC PROCESS</b>	185
Dilek YONAR, Burcu BABA, Arzu KARAYEL - <b>EVALUATION OF ZERUMBONE AS AN EGFR TYROSINE KINASE INHIBITOR BY MOLECULAR DOCKING METHOD - MOLEKÜLER YERLEŞTİRME YÖNTEMİYLE ZERUMBONUN EGFR TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRÜ OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ</b>	196
Ümit ERDOĞAN - <b>PROPOLİS EKSTRAKTI BİTKİSEL YAĞLARIN OKSİDATİF STABİLİTESİNİ İYİLEŞTİRMEK İÇİN DOĞAL BİR ANTİOKSİDAN OLARAK ÖNERİLEBİLİR - PROPOLIS EXTRACT COULD BE RECOMMENDED AS A NATURAL ANTIOXIDANT TO IMPROVE VEGETABLE OIL OXIDATIVE STABILITY</b>	208
Damla KIRCI, Betül DEMİRCİ - <b>COMPARISON OF ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF SOME POLYPHENOLIC COMPOUNDS AND THEIR BIOTRANSFORMATION EXTRACTS - BAZI POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN VE BİYOTRANSFORMASYON EKSTRELERİNİN ANTİOKSİDAN VE ANTI-ENFLAMATUVAR AKTİVİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI</b>	220
Igor BELENICHEV, Pavlo BAK, Olena POPAZOVA, Victor RYZHENKO, Nina BUKHTIYAROVA, Andrii PUZYRENKO - <b>INTEGRATIVE AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN RATS IN THE SIMULATION OF DOXORUBICIN CHRONIC HEART FAILURE AND DURING THE USE OF B-ADRENERGIC BLOCKERS - DOKSORUBİSİN İLE OLUŞTURULAN KRONİK KALP YETMEZLİĞİ MODELİNDE VE B-ADRENERJİK BLOKERLERİN KULLANIMI SIRASINDA SİÇANLARDA BÜTÜNLEYİCİ VE BİYOKİMYASAL PARAMETRELER</b>	228
Buket ALTINOK GUNES - <b>INTEGRATED BIOINFORMATIC ANALYSIS TO EVALUATE TARGET GENES AND PATHWAYS IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA - ENTEGRE BİYİNFORMATİK ANALİZ İLE KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİDE HEDEF GENLERİN VE YOLAKLARIN BELİRLENMESİ</b>	239

Şükran ÖZTÜRK - ANTİVİRAL İLAÇLARIN HASTANE ENFEKSİYON ETKENİ <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> ÜZERİNDE SİNERJİSTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI - <i>INVESTIGATION OF THE SYNERGISTIC EFFECT ON THE HOSPITAL INFECTION AGENT PSEUDOMONAS AERUGINOSA OF ANTIVIRAL DRUGS</i>	250
Burcu ÜNLÜ ENDİRLİK, Elçin BAKIR, Aysun ÖKÇESİZ, Zuhal HAMURCU, Ayşe EKEN, Aylin GÜRBAY - <i>EVALUATION OF ROUNDUP® TOXICITY IN HUMAN LUNG CELLS - İNSAN AKCİĞER HÜCRELERİNDE ROUNDUP® TOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ</i>	260
Emine Kübra YAZICI, Müjde ERYILMAZ - <i>INVESTIGATION OF THE MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION OF USED LIPSTICKS AND MASCARAS - KULLANILMIŞ RUJ VE MASKARALARDA MİKROBİYOLOJİK KONTAMİNASYONUNUN ARAŞTIRILMASI</i>	269
Halil BAL, Sulhiye YILDIZ - <i>NASAL CARRIAGE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN PHARMACIST AND PHARMACY PERSONNEL - ECZACI VE ECZANE PERSONELİNDE STAPHYLOCOCCUS AUREUS BURUN TAŞIYICILIĞI</i>	277
<i>Derlemeler / Reviews</i>	
Esra ÖZDEK, Sevtap HAN - <i>BEYİN YAŞLANMASINDA MOLEKÜLER MEKANİZMALAR - MOLECULAR MECHANISMS IN BRAIN AGING</i>	284
Merve BABAÇ, Meliha EKİNCİ, Derya İLEM-ÖZDEMİR - <i>KANSER TANISI VE TEDAVİSİNDE KULLANILAN MONOKLONAL ANTİKORLAR - MONOCLONAL ANTIBODIES USED IN CANCER DIAGNOSIS AND TREATMENT</i>	295



## THE COMPARISON OF ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF NOVEL PYRIMIDO[1,2-a]PYRIMIDINE COMPOUNDS

YENİ PİRİMİDO[1,2-a]PİRİMİDİN BİLEŞİKLERİNİN ANTİOKSİDAN VE ANTİBAKTERİYAL ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Duygu BAYRAMOĞLU<sup>1\*</sup>, Merve DEMİRBÜGEN ÖZ<sup>2</sup>, Merve Eylül KIYMACI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ankara University, Faculty of Science, Department of Chemistry, 06100, Ankara, Turkey

<sup>2</sup>Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Toxicology, 06100, Ankara, Turkey

<sup>3</sup>University of Health Sciences Turkey, Gülhane Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, 06018, Ankara, Turkey

### ABSTRACT

**Objective:** Heterocycles with a pyrimidopyrimidine scaffold have been the focus of interest of researchers in the field of medicinal chemistry as they have a wide range of biological properties. In the current study antioxidant capacity and antibacterial activity of a series of new pyrimido[1,2-a]pyrimidines were investigated

**Material and Method:** All these novel compounds were screened for their in vitro antioxidant effectiveness using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging test and the antibacterial activity was determined using the broth microdilution method according to The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing standards (EUCAST) as a minimal inhibition concentration (MIK) against some Gram-positive and negative ATCC strains.

**Result and Discussion:** The overall range of DPPH free radical scavenging activity was found to be 3.86-6.90% at 0.1mM and 6.28-16.59% at 1mM for the novel pyrimidopyrimidine derivatives. Since the free radical scavenging activities of all the compounds were below 20%, it was considered that the weak activity of compounds might be due to the absence of an enolizable amide group in the pyrimidine ring. In addition to that, some of the selected compounds showed weak antioxidant activity. MIC values of all compounds were found as > 100 µg/ml against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Enterococcus faecalis* 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. The data obtained from present study require the synthesis of derivatives

\* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Duygu Bayramoğlu  
e-mail / e-posta: bayramoglu@science.ankara.edu.tr, Phone / Tel.: +903122126720/1401-1397

with various substituents in different positions of the pyrimidine ring in order to be able to evaluate and interpret more comprehensively in future studies.

**Keywords:** Antibacterial activity, antioxidant activity, MIC, pyrimidopyrimidine, radical scavenging

## ÖZ

**Amaç:** Pirimidopirimidin yapı iskeletine sahip heterohalkalı bileşikler, sahip oldukları çok çeşitli biyolojik özellikleri sayesinde tıbbi kimya alanındaki araştırmacıların ilgi odağı olmuştur. Bu çalışma ile, bir seri yeni pirimido[1,2-a]pirimidin türevlerinin antioksidan kapasitesi ve antibakteriyel aktivitesi araştırılmıştır.

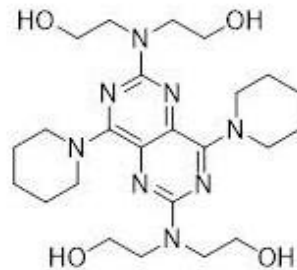
**Gereç ve Yöntem:** Sentezlenen tüm bileşiklerin *in vitro* antioksidan aktiviteleri 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme testi kullanılarak gerçekteştirilmiştir. Antibakteriyel aktivite çalışmaları, bazı Gram-pozitif ve negatif ATCC suşlarına karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) olarak Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi standartlarına göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

**Sonuç ve Tartışma:** Yeni pirimidoprimidin türevleri için DPPH serbest radikal süpürme aktivitesinin genel aralığının 0.1 mM'de %3.86-6.90 ve 1 mM'de %6.28-16.59 olduğu bulunmuştur. Tüm bileşiklerin serbest radikal süpürme aktiviteleri %20'nin altında bulunduğundan, pirimidin halkasında enolize olabilen bir amit grubunun bulunmamasından kaynaklı olarak bileşiklerin aktivitesinin zayıf olduğu düşünölmüştür. Buna ek olarak, seçilen bileşiklerin bazıları zayıf antioksidan aktivite göstermiştir. Tüm bileşiklerin MİK değerleri, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Enterococcus faecalis* 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas* 27853 ATCC'ye karşı > 100 µg/ml bulunmuştur. Bu çalışmadan elde edilen veriler, ileriki çalışmalarda daha kapsamlı değerlendirme ve yorumlama yapabilmek amacıyla pirimidin halkasının farklı konumlarında çeşitli sübtitüentlerin bulunduğu türevlerin sentezini gerektirmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Antibakteriyel etki, antioksidan etki, MİK, pirimidopirimidin, radikal süpürücü

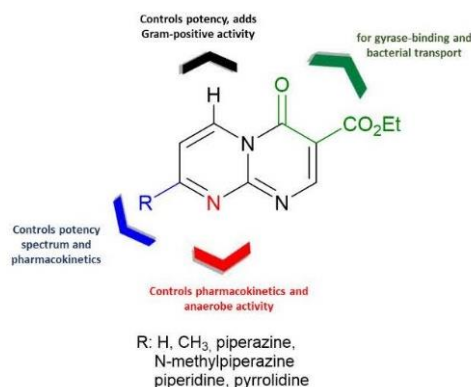
## INTRODUCTION

Pyrimidines were concerned about effectiveness in biological processes with their similarity to natural pyrimidine bases (uracil, cytosine, thymine, adenine, guanine) [1-3]. Pyrimidine compounds with their bicyclic and tricyclic derivatives are commonly studied scaffolds in medicinal chemistry because of their large spectrum of bioactivities [4-6]. Since it has been very well known that various diseases such as diabetes, stroke, and inflammation, originated from oxidative stress and its harmful effects development of compounds inhibiting oxidative stress might be considered as an efficient approach for treatment of many diseases [7-9]. Pyrimidopyrimidines are known as a specific class of fused ring-heterocycles having nitrogen heteroatoms. Pyrimidopyrimidines and their known four structural isomers have deserved interest for their biological and pharmacological activities, especially anticancer, antibacterial, antiviral and antioxidant activity. Among these, pyrimido[4,5-d]pyrimidine and pyrimido[5,4-d]pyrimidine have been used as precursors in drug research (such as dipyridamole Figure 1) owing to the existence of several simple reported methods for these compounds.



**Figure 1.** Structure of dipyridamole

Pyrimido[1,2-a]pyrimidine ring system is thought to have great similarity to ring systems of quinolone antibiotics; such as naphthalene, quinoline and naphthyridine so that new derivatives of pyrimido[1,2-a]pyrimidines with similar functional groups may produce potential antibacterial compounds. Quinolones are broad-spectrum, antibacterials that target the bacterial enzymes; topoisomerase II and topoisomerase IV [10]. On this basis, pyrimidopyrimidines could be derivatized with functional groups similar to quinolones and expected to show desired antibacterial effects (Figure 2) [11]. Pyrimido[1,2-a]pyrimidines are one of the most important members of this family. But existing studies on these compounds have not received sufficient attention. A couple of applicable synthetic methods are described in the literature for pyrimido[1,2-a]pyrimidines, but nearly all of them have been limited to only a few molecules [12-14].



**Figure 2.** Design strategy of pyrimido[1,2-a]pyrimidines

Our previous study provided a new approach for the synthesis of novel pyrimido[1,2-a]pyrimidines in high yields by reactions of 2-aminopyrimidines with diethyl ethoxymethylenemalonate (EMME) using microwave irradiation and conventional heating and published elsewhere [15]. For this purpose, in present research, it was firstly aimed to synthesize novel pyrimido[1,2-a]pyrimidines and investigate their antibacterial activity by broth microdilution method in agreement with European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) standards [16] and antioxidant activity with the use of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging assay [17,18], which are hitherto unknown in the literature. The novel derivatives were characterized by spectral data together with elemental analysis and were used for their antioxidant and antibacterial screening. Achieving the expected antibacterial and antioxidant effect will provide an alternative to the development of potential antibacterials that can be used for therapeutic purposes and which in turn might also pose antioxidant properties as well.

## MATERIAL AND METHOD

### Synthesis

A series of novel pyrimido[1,2-a]pyrimidine derivatives containing electron-withdrawing and electron-donating substituents on the ring have been successfully synthesized. All spectral analyzes and characterizations were performed and published in a previous study [15].

### Antioxidant capacity determination of newly synthesized ethyl pyrimido[1,2-a]pyrimidine-3-carboxylate derivatives (3 a-g)

#### 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity

The free radical scavenging activity of the newly synthesized compounds was evaluated by an adaptation of previously reported protocols with slight modifications by their capability to bleach the stable radical DPPH [17,18]. Test compounds (0.1mM and 1mM) were incubated with DPPH solution (150  $\mu$ M) at room temperature for 30 min. The value of 517 nm was measured as the absorbance against

a blank using a UV-Vis spectrophotometer. All experiments were carried out in triplicate. Ascorbic acid was used as a reference compound. The radical scavenging activities of the compounds were expressed as the percent of inhibition and calculated using the equation below:

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] * 100$$

Where A<sub>0</sub> is the absorbance of the control reaction and A<sub>1</sub> is the absorbance in the presence of the test compounds or standard.

### Antibacterial activity studies

Antibacterial activity of 7 different quinolone-like compounds was tested on *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *P. aeruginosa* ATCC 27853, and *E. coli* ATCC 25922. Antibacterial activity test was evaluated as a minimal inhibition concentration (MIC) in agreement with EUCAST (EUCAST, 2022b) standards by broth microdilution method. The method was performed with serial dilution of compounds in cation adjusted Mueller Hinton Broth using sterile, U bottom, 96 well plates. The bacterial suspension was obtained by 1:100 dilution of the suspension prepared from fresh bacterial culture to 0.5 Mcfarland turbidity. 100 µl bacterial suspension was added into the wells. and incubated at 35±2°C for 16 to 20 h. The minimum concentration that inhibited the bacterial growth was accepted as MIC. The tested compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The effectiveness of DMSO was also tested and ciprofloxacin was used as a positive control.

## RESULT AND DISCUSSION

### Synthesis of pyrimido[1,2-a]pyrimidines

In our previous study, various experimental conditions such as different solvents, reaction temperatures, and also the molar ratio of reagents had been examined in detail both for the conventional heating and microwave irradiation to find the optimum conditions for the synthesis of pyrimido[1,2-a]pyrimidines (3a-g). In all cases, the best solvent was chosen as diphenyl ether owe to its inert nature. The optimum temperature interval was determined as 200-220°C degrees. Above this temperature decomposition reactions occurred, and tar-like masses were observed. When the temperature was held under this temperature range, only mono-adduct enamine was obtained. Heating strategies were also compared and it was observed that microwave-assisted synthesis was the most applicable method for this type of cyclization reaction. The basic synthetic process consists of two steps; syntheses of 4-substituted 2-aminopyrimidines and then cyclization of these 2-aminopyrimidines with EMME in one-step under optimal conditions. Consequently, pyrimido[1,2-a]pyrimidines derivatives bearing one substituent (CH<sub>3</sub>, pyrrolidinyl, piperidinyl and/or morpholinyl) at the 8- position have been synthesized with good yields Figure 3 [15].

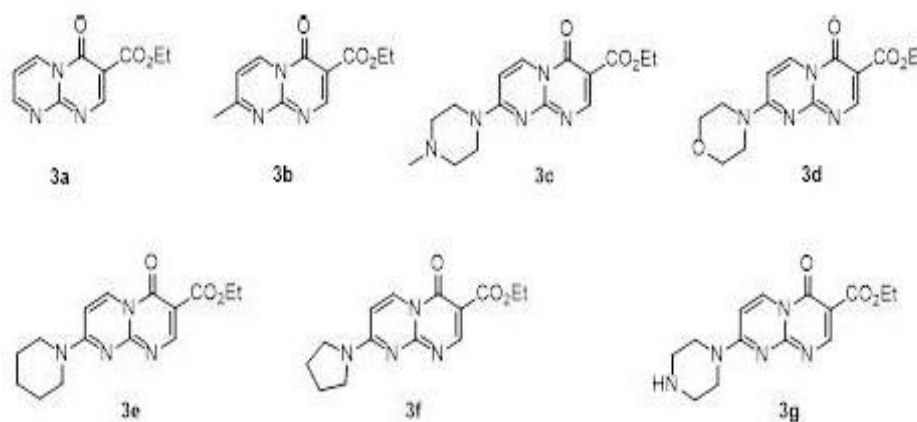
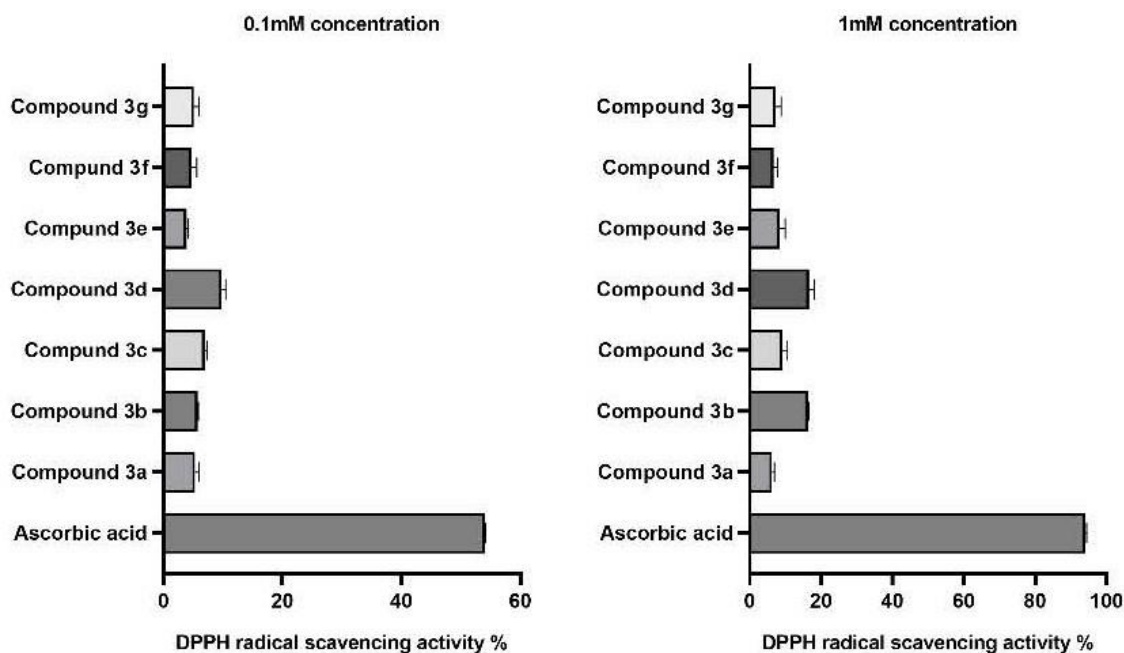


Figure 3. Synthesized pyrimido[1,2-a]pyrimidines

### Antioxidant activity:

*In vitro* antioxidant activities of the novel pyrimido[1,2-a]pyrimidines were determined using DPPH radical scavenging tests, as shown in Figure 4 and Table 1. The results obtained were compared with standard ascorbic acid antioxidant activity. A major part of the new compounds exhibited low to moderate interaction with the DPPH radical at 0.1 mM and 1.0 mM concentrations compared to ascorbic acid as standard. Maximum DPPH radical scavenging activity was observed in the synthetic compounds.



**Figure 4.** (A) DPPH radical scavenging activity (%) of the compounds at 0.1mM (B) DPPH radical scavenging activity (%) of the compounds at 1mM. The DPPH scavenging activity of ascorbic acid (reference compound) was used for comparison and is shown in the graphs

**Table 1.** DPPH radical scavenging activities of the compounds

Compounds	DPPH free radical scavenging activity (%)	
	0.1mM	1mM
<b>3a</b>	5.27±0.69	6.28±0.62
<b>3b</b>	5.75±0.11	16.27±0.92
<b>3c</b>	6.90±0.37	9.11±1.51
<b>3d</b>	9.80±0.62	16.59±1.50
<b>3e</b>	3.86±0.32	8.29±1.63
<b>3f</b>	4.61±0.96	6.69±1.10
<b>3g</b>	5.06±0.91	7.36±1.44
<b>Ascorbic acid</b>	54.02±0.11	93.93±0.48

Values are expressed as means ± standard deviation (S.D.) of three different experiments.

Radical scavenging activities of all compounds were designated by the interacting capability of compounds with DPPH as stable free radicals. Compound 3a, having no substituent on the pyrimido[1,2-a]pyrimidine, was chosen as a model compound for evaluating its DPPH radical scavenging activity. Compound 3a has been tested in 0.1 mM and 1mM concentrations for radical scavenging activity. All compounds in these series were screened for their antioxidant activity in both concentrations mentioned above. The antioxidant activities were expressed in Table 1 and the results were compared with ascorbic acid. The results shown in Table 1 reveal that all compounds have weak antioxidant activity compared to ascorbic acid. The overall range of DPPH radical scavenging activity was found to be 3.86-6.90 at

0.1 mM and 6.28–16.59 at 1 mM. It can be seen from the results that free radical scavenging activities of all the compounds were below 20%. It was considered that the weak activity of compounds might be due to the absence of an enolizable amide group in the pyrimidine ring. According to current results maximum DPPH radical scavenging activity at 1 mM was obtained in compounds 3b and 3d, which possess a methyl and a morpholinyl group at the 8- position of the pyrimido[1,2-a]pyrimidine ring. Both radical scavenging activities of 3b and 3d were weaker than the standard ascorbic acid, so they could be considered as a moderate reducing agent.

### Antibacterial activity

The MIC values of all compounds tested were found higher than 100 µg/ml against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Enterococcus faecalis* 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853/2922. The results were given in Table 2. Considering the activity of the synthesized compounds, it is thought that the compounds may have an antibacterial activity above the tested concentrations. Since there is no publication about present test compounds in the literature, a comparison could not be made. However, when the results are evaluated according to EUCAST standards, the effective concentration of quinolone antibiotics currently in use, such as ciprofloxacin, varies according to bacteria species but is quite low, and the results obtained from the control strains in this study are listed in Table 2. Therefore, an effect that can be detected at a concentration above 100 µg/ml was not tested in the present study, as it would not be considered as effective compared to the standards and literature examples [19].

**Table 2.** Antibacterial activity results for tested compounds as MIC

Compounds	Minimal inhibition concentrations (µg/ml)					
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
3-a, 3-b, 3-c, 3-d, 3-e, 3-f, 3-g	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
Ciprofloxacin	0.25	0.5	0.5	0.0625	0.25	0.0078

It is thought that this may be due to the absence of fluorine atoms in the ester forms of the compounds. Fluoroquinolones, such as ciprofloxacin that used as control in present study, show their mechanism of action by inhibiting DNA topoisomerases of most Gram-negative and Gram-positive bacteria and act at low concentrations [20], for example, ciprofloxacin MIC value were differs between 0.004-0.016 mg/ml for *E. coli* ATCC 25922 [21]. The current study is important as it will provide data to the literature in terms of antibacterial test results.

Due to their privileged biological properties, heterocycles with pyrimidopyrimidine scaffolds have been the focus of the attention of researchers. These heterocycles are used as antibacterial agents, cancer cell growth inhibitors, antioxidants, antiviral agents, and antitumor agents [22-25]. Therefore, the current study aimed the investigate the new series of pyrimido[1,2-a]pyrimidine derivatives for their antibacterial and antioxidant potentials. Overall, the free radical scavenging abilities of all synthesized compounds were considered with the stable DPPH radical methods. Antibacterial activity of all compounds against some Gram-positive and Gram-negative bacteria was tested and it was determined that test compounds could show dose-dependent activity. It was also evaluated that a number of the selected compounds showed weak antioxidant activity. Therefore, this preparatory study can be considered promising research to further investigate their broad spectrum of pharmacological activities. The previous studies which performed on pyrimido[1,6-a]pyrimidine, pyrimido[1,6-c]pyrimidine and pyrido[2,3-d]pyrimidine skeletons provided efficient biological activities [26, 27]. Therefore, since the expected biological activities could not be observed with the present substitutions of the pyrimido[1,2-a]pyrimidine ring, the synthesis of various substituents from different positions of the pyrimidine scaffold is required for further evaluation in future studies.



## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: D.B.; Design: D.B., M.D.Ö., M.E.K.; Control: D.B.; Sources: D.B., M.D.Ö., M.E.K.; Materials: D.B., M.D.Ö., M.E.K.; Data Collection and/or Processing: D.B.; Analysis and/or Interpretation: M.D.Ö., M.E.K.; Literature Review: D.B., M.D.Ö., M.E.K.; Manuscript Writing: D.B.; Critical Review: D.B., M.D.Ö., M.E.K.; 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. Sahu, M., Siddiqui, N. (2016). A review on biological importance of pyrimidines in the new era. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Research*, 8(5), 8-21.
2. Lagoja, I.M. (2005). Pyrimidine as constituent of natural biologically active compounds. *Chemistry & Biodiversity*, 2(1), 1-50. [CrossRef]
3. Baumann, M., Baxendale, I.R. (2013). An overview of the synthetic routes to the best-selling drugs containing 6-membered heterocycles. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 9(1), 2265-2319. [CrossRef]
4. Abbas, S.E., Gawad, N.M.A., George, R.F., Akar, Y.A. (2013). Synthesis, antitumor and antibacterial activities of some novel tetrahydrobenzo [4,5] thieno [2,3-d] pyrimidine derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 65, 195-204. [CrossRef]
5. Buron, F., Mérour, J.Y., Akssira, M., Guillaumet, G., Routier, S. (2015). Recent advances in the chemistry and biology of pyridopyrimidines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 95, 76-95. [Crossref]
6. Hossan, A.S., Abu-Melha, H.M., Al-Omar, M.A., Amr, A.E.G.E. (2012). Synthesis and antimicrobial activity of some new pyrimidinone and oxazinone derivatives fused with thiophene rings using 2-chloro-6-ethoxy-4-acetylpyridine as starting material. *Molecules*, 17(11), 13642-13655. [CrossRef]
7. Asmat, U., Abad, K., Ismail, K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(5), 547-553. [CrossRef]
8. Rodrigo, R., Fernandez-Gajardo, R., Gutierrez, R., Manuel Matamala, J., Carrasco, R., Miranda-Merchak, A., Feuerhake, W. (2013). Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 12(5), 698-714. [CrossRef]
9. Biswas, S.K. (2016). Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. [CrossRef]
10. Naeem, A., Badshah, S.L., Muska, M., Ahmad, N., Khan, K. (2016). The current case of quinolones: synthetic approaches and antibacterial activity. *Molecules*, 21(4), 268. [CrossRef]
11. Andersson, M.I., MacGowan, A.P. (2003). Development of the quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), 1-11. [CrossRef]
12. Hurd, C.D., Hayao, S. (1955). Reaction of propiolactone with heterocyclic amines. *Journal of the American Chemical Society*, 77(1), 117-121. [CrossRef]
13. Kappe, T. (1967). Synthesen von Heterocyclen, 95. Mitt.: Chinolizine und Indolizine I: Eine Synthese von 2-Hydroxychinolizinonen-(4). *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 98(3), 874-886. [CrossRef]
14. Güllü, M., Dinçsönmez, A., Özyavaş, Ö. (2010). Facile Synthesis of Novel Pyrimido[1, 2-a]pyrimidin-4-ones from Highly Reactive Malonates. *European Journal of Organic Chemistry*, 11, 2113-2120. [CrossRef]
15. Bayramoğlu, D., Güllü, M. (2021). An Efficient Synthetic Method for the Synthesis of Novel Pyrimido [1,2-a] pyrimidine-3-carboxylates: Comparison of Microwave and Conventional Heating. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 42(8), 4948-4964. [CrossRef]
16. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Web site. (2022). From <https://www.eucast.org>. Erişim tarihi: 01.01.2022.
17. Alam, M.N., Bristi, N.J., Rafiqzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152. [CrossRef]
18. Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200. [CrossRef]

19. Leyva-Ramos, S., de Loera, D., Cardoso-Ortiz, J. (2017). In vitro antibacterial activity of 7-substituted-6-fluoroquinolone and 7-substituted-6,8-difluoroquinolone derivatives. *Chemotherapy*, 62, 194-198. [\[CrossRef\]](#)
20. Smith, A., Pennefather, P.M., Kaye, S.B., Hart, C.A. (2001). Fluoroquinolones. *Drugs*, 61(6), 747-761. [\[CrossRef\]](#)
21. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Web site. (2022). From <https://www.eucast.org> Erişim tarihi: 01.01.2022.
22. Solca, F.F., Baum, A., Langkopf, E., Dahmann, G., Heider, K.H., Himmelsbach, F., Meel, J.C.A. (2004). Inhibition of epidermal growth factor receptor activity by two pyrimidopyrimidine derivatives. *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311(2), 502-509. [\[CrossRef\]](#)
23. Cruz, J.P., Carrasco, T., Ortega, G., Cuesta, F.S. (1992). Inhibition of ferrous-induced lipid peroxidation by pyrimido-pyrimidine derivatives in human liver membranes. *Lipids*, 27(3), 192-194. [\[CrossRef\]](#)
24. Sharma, P., Rane, N., Pandey, P. (2006). Synthesis and evaluation of antimicrobial activity of novel hydrazino and N-benzylidenehydrazino-substituted 4,8-dihydro-1H,3H-pyrimido[4,5-d]pyrimidin-2,7-dithiones. *Archiv de Pharmazie*. 339(10), 572-578. [\[CrossRef\]](#)
25. Krueger, A.C., Madigan, D.L., Beno, D.W., Betebner, D.A., Carrick, R., Green, B.E., He, W., Liu, D., Maring, C.J., Daniel, K.F., Mo, H., Molla, A., Motter, C.E., Pilot-Matias, T.J., Tufano, M.D., Kempf, D.J. (2012). Novel hepatitis C virus replicon inhibitors: synthesis and structure-activity relationships of fused pyrimidine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 22(6), 2212-2215. [\[CrossRef\]](#)
26. Ellatar, K.M., Mert B.D., Monier, M., El-Mekabaty, A. (2020). Advances in the chemical and biological diversity of heterocyclic systems incorporating pyrimido[1,6-a]pyrimidine and pyrimido[1,6-c]pyrimidine scaffolds. *RSC Advances*, 10(26), 15461-15492. [\[CrossRef\]](#)
27. Saundane, A.R., Vjaykumar, K., Vaijinath, A.V., Walmik, P. (2013) Synthesis, antimicrobial and antioxidant activities of some new indole derivatives containing pyridopyrimidine and pyrazolopyridine moieties. *Medicinal Chemistry Research*, 22, 806-817. [\[CrossRef\]](#)



## MUCOADHESIVE ORODISPERSIBLE FILM FORMULATIONS OF RASAGILINE MESYLATE FOR PARKINSON TREATMENT

*PARKİNSON TEDAVİSİ İÇİN RASAJİLİN MESİLAT MUKOADEZİF AĞIZDA DAĞILAN  
FİLM FORMÜLASYONLARI*

Meliha GÜNEŞ<sup>1</sup> , Gökçe TURAN<sup>1</sup> , Armağan DÖNMEZER<sup>1</sup> , Fadime AYDIN KÖSE<sup>2</sup> ,  
Özgen ÖZER<sup>1</sup> , Sinem Yaprak KARAVANA<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Ege University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, 35040, Izmir,  
Turkey

<sup>2</sup>Katip Çelebi University Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, 35620, Izmir, Turkey

### ABSTRACT

**Objective:** *The article is included formulation studies and in vitro evaluation of orally dispersible Rasagiline mesylate (RM) orodispersible films (ODFs) for non-oral treatment of Parkinson's Disease. RM undergoes extensive hepatic biotransformation and is a highly selective and irreversible MAO-B inhibitor. It is metabolized in the liver and has an oral bioavailability of approximately 36% and a half-life of 3 hours. These properties suggest that RM may be an excellent candidate for buccal drug delivery.*

**Material and Method:** *ODFs of RM were prepared using PEO by the solvent casting method. While evaluating these formulations, parameters such as appearance, weight homogeneity, thickness, surface pH, drug content, swelling ratio, tensile strength, mucoadhesion, in vitro drug release studies and also stability were considered.*

**Result and Discussion:** *Obtained results show that ODFs are an effective and viable approach for RM delivery and may be a new alternative to existing oral delivery systems for Parkinson's treatment.*

**Keywords:** *Buccal delivery, orodispersible film, polyethylene oxide, rasagiline mesylate*

\* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Sinem Yaprak Karavana  
**e-mail / e-posta:** sinemyaprak@hotmail.com, **Phone / Tel.:** +905326113241

**Submitted / Gönderilme :** 29.07.2022

**Accepted / Kabul :** 06.10.2022

**Published / Yayınlanma :** 20.01.2023

## ÖZ

**Amaç:** Bu makale, Parkinson Hastalığının oral olmayan tedavisi için Rasagilin mesilat (RM) ağızda dağılan filmlerin (ODF'ler) formülasyon çalışmalarını ve *in vitro* değerlendirmesini içermektedir. RM, özellikle yoğun hepatik biyotransformasyona uğrayan geri döndürülemez ve yüksek seçiciliğe sahip bir MAO-B inhibitörüdür. Karaciğerde metabolize edilir ve oral biyoyararlanımı yaklaşık %36 ve yarılanma ömrü 3 saattir. Bu özellikler, RM'nin bukkal ilaç dağıtımı için mükemmel bir aday olabileceğini göstermektedir.

**Gereç ve Yöntem:** RM'nin ODF'leri, solvent döküm yöntemiyle PEO kullanılarak hazırlandı. Bu formülasyonlar değerlendirilirken görünüş, ağırlık homojenliği, kalınlık, yüzey pH'sı, ilaç içeriği, şişme oranı, gerilme mukavemeti, mukoadezyon, *in vitro* ilaç salım çalışmaları ve stabilite gibi parametreler göz önünde bulundurulmuştur.

**Sonuç ve Tartışma:** Elde edilen sonuçlar, ODF'lerin RM uygulaması için etkili ve uygulanabilir bir yaklaşım olduğunu ve Parkinson tedavisi için mevcut oral dağıtım sistemlerine yeni bir alternatif olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Ağızda dağılan film, bukkal uygulama, polietilen oksit, rasagilin mesilat

## INTRODUCTION

Parkinson Disease (PD) is a chronic and progressive disease, so the symptoms become worse in the course of time. It's characterized by motor symptoms associated with movement like tremors, stiffness, or rigidity of the muscles. In addition to motor symptoms, non-motor symptoms like sleep problems, depression, anxiety, constipation, and fatigue related to PD can occur in patients [1].

The efficacy of levodopa, which has long been accepted as the 'gold standard' and administered orally for the control of motor symptoms in patients with PD, appears to decrease as the duration of treatment increases. Since the effects of orally used drugs start late, OFF periods are seen in the early morning hours in Parkinson's patients. It has been reported that the OFF period complicates the morning routines of the patients and significantly affects their quality of life. Dysfunctions in the gastrointestinal track occur at all levels of PD and this causes motor fluctuations in the advanced levels of PD, which makes the management of the disease difficult. Transmucosal routes such as intranasal, buccal, sublingual and rectal are used as an alternative to the oral route due to their advantages such as being non-invasive, possibility of self-administration, rapid drug absorption, high bioavailability and successful systemic delivery of the active substance to the circulation. Among the transmucosal routes, buccal administration, excellent accessibility, non-invasiveness of administration of the dosage form, rapid blood supply and permeable mucosa make it a highly attractive route for drug delivery for systemic action [2].

Rasagiline mesylate (RM) is an irreversible MAO-B inhibitor. RM is a freely soluble active substance with a biological half-life of 3 hours and a dose of 0.5-2 mg per day. RM is an irreversible MAO-B inhibitor [3]. RM's absolute bioavailability is 36% due to the metabolism by N-dealkylation and hydroxylation in liver. Because it is an effective active substance with low oral bioavailability, RM is a very suitable candidate for transmucosal administration [4].

Orally dispersible films (ODFs) are drug delivery systems intended to disperse rapidly after administration into the oral cavity. ODFs which are commonly prepared with hydrophilic polymers are dosage forms by means of suitable size, thickness, and easy application which provide easy patient compliance. Solvent casting method is one of the methods frequently used in the production of ODFs. In this method, after the film-forming agents are dissolved in designated solvent, the solution is poured onto a flat surface and dried [5]. When placed on the tongue, formulations immediately moisten with saliva and then rapid disintegration and/or dissolution occurs and the release the active pharmaceutical substance happened [6]. They are preferred over solid dosage forms in terms of flexibility, application without water needed and improved patient comfort. They also provide more accurate drug dosing and longer residence time in buccal mucosa as compared to semi-solid dosage forms [2].

The present research represents the preformulation studies, formulation development and *in vitro* evaluation of mucoadhesive ODFs of RM.

## MATERIAL AND METHOD

### Materials

RM was gifted from Ali Raif Pharmaceutical Industry, Turkey, polyethylene oxide (PEO) purchased by Sigma-Aldrich, USA, glycerol (GLY) (98%) was purchased by Merck, Germany. Mouse embryonic fibroblast cells (NIH/3T3) and cell lines purchased from ATCC, USA were employed. Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) with L-Glutamine, sterile phosphate-buffered saline (PBS), fetal bovine serum (FBS) and trypsin-EDTA was obtained from Biowest, France. Trypan Blue solution was purchased from Biological Industries (Israel). ThinCert cell culture insert, and other cell culture plastics were supplied from Greiner Bio-One, Germany. 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitro-phenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene sulfonate (WST-1) cell proliferation reagent was obtained from Roche Diagnostics, Germany. All chemicals were of analytical grade.

### Preparation of Mucoadhesive ODFs

In our study, solvent casting method was preferred to prepare mucoadhesive ODFs. 1.56 mg RM added into 35 ml distilled water (DS) per ODF (6 cm<sup>2</sup>). Different concentrations of PEO were slowly added to these solutions and stirred using a magnetic stirrer for 24 h. Then glycerin (GLY) added and then mixtures were ultrasonicated to acquire bubble-free gels and kept a side at least 6 hours. Then solutions were poured on petri dishes and kept in controlled room temperature for 24 h. After drying, ODFs were cut to 6 cm<sup>2</sup> (2×3 cm<sup>2</sup>).

**Table 1.** Composition of ODFs\*.

	F1	F2	F3	F4
PEO	0.5 g	0.6 g	0.7 g	0.8 g
GLY	0.025 g	0.030 g	0.035 g	0.040 g

\*1.56 mg RM added into DW per ODF (6 cm<sup>2</sup>) for drug loaded ODFs.

### Physical Properties

By examining the general appearances of the ODFs; It was checked whether they can be separated from the petri dish and have sufficient homogeneity, flexibility, softness, and stickiness.

### Weight Uniformity and Thickness

The formulations were weighed separately on a precision balance (Sartorius Basic, Göttingen, Deutschland). The average weights and standard deviations were calculated. A digital micrometer (Mitutoyo, Japan) was used to measure the thickness of the ODFs. The average thickness and standard deviations were calculated (n=6).

### Drug Content and Content Uniformity

RM amount of ODF formulations was analyzed with a fully validated HPLC method according to the ICH guidelines. Drug content and content uniformity studies are performed with Agilent series 1100-1200 HPLC apparatus with an UV detector at 265 nm, using 5 µm, 4.6 × 250 mm C18 column. A mixture of ammonium acetate buffer/acetonitrile (60:40, v/v) was chosen as the mobile phase and flow rate was determined as 1.0 ml/min at 25°C. Injection volume of 20 µl and run time of 10 min was optimized for the final method [7].

The drug content and content uniformity tests were performed by dissolving an ODF in 40 ml of simulated saliva fluid (SSF) and ethanol mixture (50:50) with stirring for 30 minutes (n=6).

### Swelling Ratio Determination

The RM-loaded ODFs were weighed (W1) and adhered to pre-weighed coverslips. The prepared coverslips were then thrown into 20 ml of SSF at 37°C. At certain times the coverslips were removed, and excess of solvent was soaked by a filter paper then weighed (W2). Until a constant weight was

obtained, the increase in the weight of the ODFs was evaluated (n=6) by using the following equation (Equation 1) [8].

$$\text{Swelling ratio \%} = (W_2 - W_1) / W_1 * 100 \quad \text{Equation 1}$$

### **In Vitro Disintegration**

ODFs were placed in a 20 ml SSF beaker at 37°C to determine the *in vitro* degradation time (n=6) and their disintegration time was evaluated only visually (n=6) [9].

### **Surface pH**

Formulations were allowed to swell for 10 minutes in the beaker containing 5 ml distilled water. The probe of the pH meter was brought into contact with the ODF surface and allowed to equilibrate for 1 minute to determine the pH [10].

### **Determination of Tensile Strength**

The study was performed at least six times with a profile analyzer (TA-TX Plus, Stable Micro System, UK) using a 500 g load cell according to the parameters given in Rençber vd. 2019. The following Equation 2 was used to calculate the results:

$$\text{Tensile strength (N.mm}^{-2}\text{)} = \text{Force at break} / \text{Area of the sample (mm}^2\text{)} \quad \text{Equation 2}$$

### **Evaluation of the Mucoadhesive Properties**

Mucoadhesion properties were determined at least six times with texture profile analyzer at 37°C according to the parameters given in Karavana vd., 2018 and Tomar vd., 2012. Maximum separation force and mucoadhesion values were obtained from the force-distance plot.

### **In Vitro Dissolution Study**

*In vitro* dissolution studies of ODFs were carried out with 35 ml of SSF at 37±0.5°C using USP type II. Medium was stirred at 100 rpm and samples were taken at 1-minute intervals by adding the same amount of fresh medium as the sample taken to keep the dissolved medium constant (n=6) [11].

### **Cell Culture and In Vitro Cytotoxicity Assay**

WST-1 proliferation assay evaluated the cytotoxicity potential of the formulations against HEK-293T and NIH-3T3 [12]. WST-1 reagent reduces to the water-soluble formazan dye by the end of the cellular mechanism in live cells. Therefore, the intensity of the color developed in the experimental environment is proportional to the number of living cells. HEK-293T and NIH-3T3 cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air in DMEM containing 2 mM glutamine and 10% FBS [12,13].

Cells were suspended in fresh medium for cytotoxicity experiments and seeded at the bottom of 12-well ThinCert™ plates at a density of 5x10<sup>5</sup> cells. Plates were placed in a CO<sub>2</sub> incubator and incubated for 18 hours. Before the study, the medium was replaced with 1 ml of fresh medium, and ThinCert™ inserts (pore size: 0.4 µm) were placed in each well.

ODF formulations were added to inserts followed by sterilization with UV light for 8 hours, with an extra 0.5 ml of DMEM. Cells were treated with formulations for 12, 24, 48 and 72 hours. Finally, the inserts were removed, and the medium was replaced with WST-1:medium (1:10) and incubated for an additional 4 hours. The absorbance value of the wells was measured at 450 nm using the CLARIOstar Plus Microplate Reader (BMG LabTech, Germany). Results were represented as the % percentage of formazan absorbance (Mean ± Standard Deviation, Mean ± SD). Statistical analysis of the results was calculated by one-way variance analysis using the GraphPad Prism 5.0 software. The significance level was accepted as p < 0.05.

## Stability Studies

The ODFs were wrapped in aluminum foil, packed in glass container, and kept in stability chambers, at  $25\pm 0.5^\circ\text{C}$  and  $60\pm 5\%$  relative humidity and  $40\pm 0.5^\circ\text{C}$  and  $75\pm 5\%$  relative humidity for 3 months respectively. After 1, 2 and 3 months, ODFs were tested for changes in appearance, drug content, pH and disintegration time.

## RESULT AND DISCUSSION

RM is one of the most prescribed drugs as monotherapy or in addition to levodopa in people who suffer from PD. This study includes successfully preparing and characterising RM loaded ODFs prepared by solvent casting. The developed ODFs were evaluated for various physicochemical properties such as weight uniformity, thickness, drug content and content uniformity, surface pH, tensile strength, swelling ratio, disintegration time, mucoadhesive properties, *in vitro* drug release, *in vitro* cytotoxicity assay and also stability study.

The PEO was used as film formers and GLY as a plasticizer for ODFs formulations. PEO provided the formulations with optimum physicochemical properties such as high mucoadhesiveness and easy applicability. GLY was added to ODF formulations to increase flexibility and reduce brittleness. For formulation development studies, ODFs without active substance were prepared with different ratios of PEO and GLY. F1 and F2 coded ODFs were separated easily from petri dishes and are homogeneous, flexible, smooth, soft, and adhesive. Studies on the F3 and F4 formulations were not continued because the viscosities of their solutions were too high, and air bubbles could not be removed despite many attempts.

### Weight Uniformity and Thickness

Weight uniformity and thickness are parameters that must be considered to ensure precision and homogeneity of the dose administered to patients using ODF. The results of these studies were given in Table 2. The thickness of all formulations was found to be in the range of 0.37 mm to 0.67 mm, meaning that a thin ODF can be prepared that can be beneficial as it causes minimal discomfort to patients. The thickness of all formulations was found to be in the range of 0.37 mm to 0.67 mm, meaning that a thin ODT can be prepared that can be beneficial as it causes minimal discomfort to patients.

The weight of ODFs were found in the range of  $0.031\pm 0.001$  to  $0.039\pm 0.009$  g. The formulation F1 showed minimum weight due to ratio of polymer. The polymer ratio and the presence of RM in the ODFs slightly changed the weight. But the standard deviation values detected in all samples were very low, indicating that the weights of the prepared formulations were uniform. The homogeneity of ODFs is a key parameter to ensure predictable drug release from formulations with uniform distribution of drug [14]. The thickness was determined using a digital micrometer and according to the determined thickness results, as the polymeric amount increased; It was observed that the thickness of the ODFs increased. The thickness of all formulations was found to be in the range of 0.37 mm to 0.67 mm, meaning that a thin ODF can be prepared that can be beneficial as it causes minimal discomfort to patients.

**Table 2.** Physicochemical properties of ODFs.

Code	Thickness (mm)	Weight (g)	Swelling Ratio	Disintegration time (sec)	Surface pH
F1	$0.037\pm 0.01$	$0.031\pm 0.001$	$37.7\pm 0.04$	$29.91\pm 0.52$	$6.88\pm 0.02$
F2	$0.067\pm 0.01$	$0.037\pm 0.004$	$41.2\pm 0.04$	$64.73\pm 0.52$	$7.12\pm 0.05$
F1E	$0.055\pm 0.02$	$0.033\pm 0.004$	$29.9\pm 0.06$	$12.39\pm 0.64$	$7.33\pm 0.20$
F2E	$0.050\pm 0.01$	$0.039\pm 0.009$	$35.5\pm 0.05$	$20.69\pm 0.64$	$7.45\pm 0.07$

### Swelling Ratio Determination

The hydration of ODFs depends on the type and physicochemical nature of the polymers. Swelling, which begins with contact with water, allows the structure of bioadhesive polymers that are initially stretched, twisted, or entangled to relax, resulting in rapid dissolution of polymer chains and the formation of a macromolecular structure that increases the porosity of the ODF and initiates drug release. However, increased swelling of ODFs can cause discomfort for patients [15-17]. The swelling behaviour of formulations shows their bioadhesive property and drug release of the formulation was determined at various time intervals. ODF formulations were found to exhibit good swelling behavior. It was observed that the formulation F2 showed the highest swelling index due to greater swelling of PEO. It indicates that when ODFs placed in an aqueous medium, liquid penetrates into ODFs and a gel is formed. Swelling increases as the time proceeds because the polymer gradually absorbs water due to hydrophilicity of polymer [18].

### In Vitro Disintegration

*In vitro* disintegration time was measured and was approximately 12.39±0.64 to 64.73±0.52 min, respectively. Results of *in vitro* disintegration time of ODFs were shown in Table 2. It was observed that the increase in polymer concentration and viscosity increased the disintegration and dissolution time, and this was found to be consistent with the literature. In addition, *in vitro* disintegration time increased with a higher amount of PEO in all formulations.

### Surface pH

If the pH difference between the applied dosage form and the buccal mucosa is not large, the possibility of causing any problems in the application area is reduced. The pH of the ODFs was examined for any sensitization or allergic reaction with buccal use. As the surface pH for all formulations is close to the buccal pH, it is considered that it will not cause irritation to the mucosa. Surface pH of all formulations was seen to be compatible with salivary pH. For this reason, it was determined that the formulations did not have a risk of irritation on the oral mucosa. The pH values of ODFs were found to be almost neutral (pH 6.88-7.45) and near to the buccal pH which was 6.8.

### Drug Content and Content Uniformity

Content uniformity is an essential pharmaceutical quality control criteria evaluated to control drug homogeneity in pharmaceutical products. The data displayed in Table 3 signifies higher drug content >98% in ODFs. Consistent values between ODF formulations show that the change in polymer ratio does not affect the RM content and homogeneous formulations can be prepared. The results showed acceptable drug content changes, so the ODFs have uniform drug distribution.

**Table 3.** Drug content of RM loaded ODFs.

Code	Drug content %
F1E	98.68±2.25
F2E	99.87±3.52

### Determination of Tensile Strength

The mechanical strength of ODF formulations is a very important factor not only in production or formulation development stages, but also in terms of ease of use by the patient. Different factors affect the mechanical properties of formulations, such as the type and amount of film-forming agent, plasticizer type and amount, type and amount of residual solvents, weight and thickness of ODF, manufacturing process, storage conditions, and type and amount of active substance. The results of the tensile strength test are shown in Table 4. The mechanical characteristics of polymers are affected by the preparation process of the formulation, and the temperature and humidity of the environment, so it is difficult to compare the values in one study with other studies. No specific values are also determined for tensile



strength for mucoadhesive buccal ODF. The results obtained in this study for ODFs with different PEO ratios were in accordance with the results of other published studies [17].

**Table 4.** Tensile strength of ODFs.

Formulation Code	Tensile strength (N/mm <sup>2</sup> )
F1	0.1±0.05
F2	0.1±0.05
F1E	0.04±0.03
F2E	0.09±0.03

### Evaluation of the Mucoadhesive Properties

The mucoadhesive property of ODFs is an important parameter in prolonging the residence time in the buccal region and preventing the removal of the formulation by mucosal secretion. Therefore, it is beneficial to use mucoadhesive formulations to strengthen the interaction between ODFs and mucosa in the development process [19]. The data in Table 5 demonstrates that ODFs possessed adequate mucoadhesive force (>152 mN). Indeed, the high mucoadhesive strength of ODFs favours their long residence time in the buccal mucosa. Studies with a neutral polymer, PEO, show that polymer concentration affects mucoadhesion. This is thought to be due to the viscosity of the polymer solution.

**Table 5.** Mucoadhesive properties of ODFs.

Formulation Code	Mucoadhesion Force (mN)	Work of Adhesion (mN.mm)
F1	152.37±2.03	52.54±1.03
F2	272.60±2.80	11.58±1.17
F1E	236.86±1.08	81.67±1.07
F2E	302.63±1.02	126.09±2.04

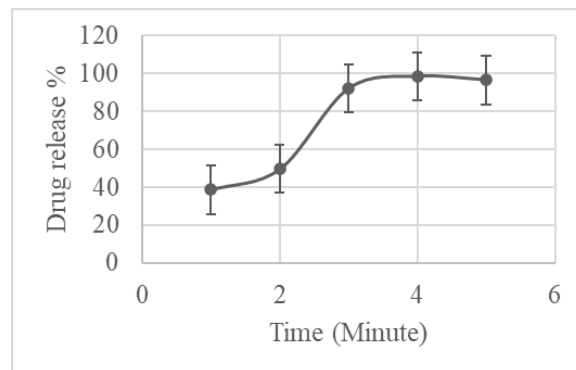
### In Vitro Dissolution Study

*In vitro* drug release studies are important to learn about the release of active substances from ODF and subsequent passage through the buccal mucosa. The correlation between *in vitro* release data and *in vivo* absorption has also been demonstrated by different studies [14]. In addition, it is known that drug delivery from a formulation is primarily determined by the properties of drugs and polymers. The release of the drug from the ODF depends on the drug/polymer properties, the solubility of the drug, the diffusion of the drug from the ODF, the swelling properties of the polymer matrix and the disintegration time [17]. Although the solubility of RM is not expected to have a negative effect on dissolution and absorption based on the information obtained as a result of the literature searches, a dissolution study was performed at pH 6.8 (physiological pH of the oral cavity). The swelling and dissolution characteristics of some natural polymers are affected by salivary fluid's ion concentration, osmolality, surface tension, viscosity, etc. [18,19]. These features were not taken into account in this study. *In vitro* release of RM from ODFs are shown in Figure 1 and Figure 2. A rapid drug release was seen in both formulations, although there were differences between the two formulations. For F1 formulation, more than 50% of RM was released in the first 2 min and more than 100% in the first 4 min. The release was fast from F1 because of the polymer ratio. For F2 formulation, more than 50% of RM was released in the first 4 min and more than 100% in the first 8 min.

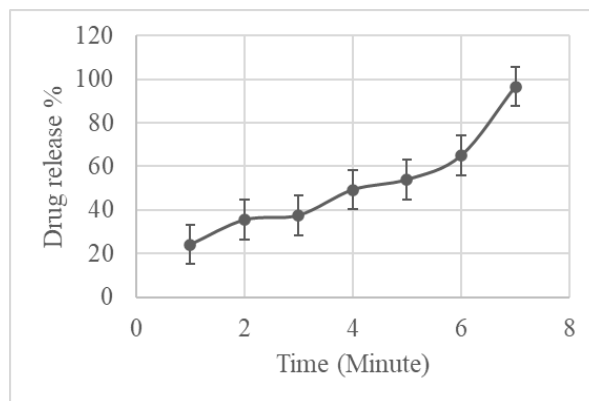
### Cell Culture and In Vitro Cytotoxicity Assay

Cytotoxicity experiments are a significant step in the pharmaceutical development process. For this purpose, empty and RM-loaded ODF formulations were tested on two healthy well-defined cell lines: human kidney embryonic epithelial cell line (HEK-293T) and mouse embryonic fibroblast cell

line (NIH-3T3). These cell lines are commonly used for preliminary cytotoxic test novel formulations [20].



**Figure 1.** *In vitro* drug release from F1E.



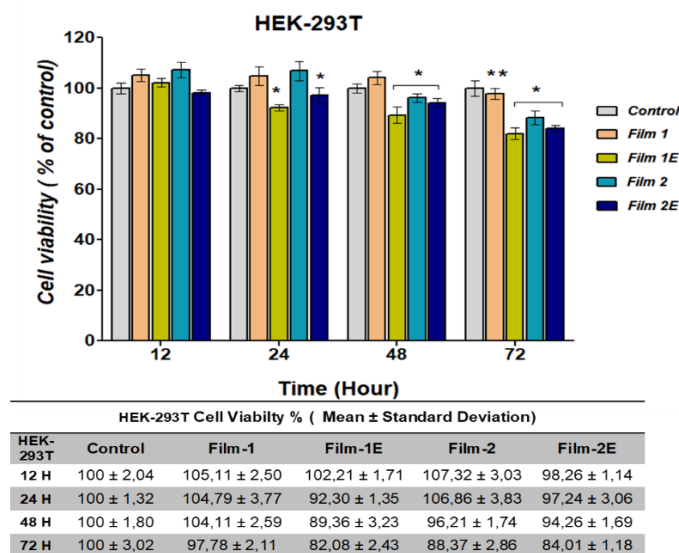
**Figure 2.** *In vitro* drug release from F2E.

HEK-293T and NIH-3T3 cells were incubated with empty and RM-loaded ODFs for various times (12, 24, 48 and 72 hours) in ThinCert™ plates. Then, the cytotoxic potential of formulations was determined by WST-1 cell proliferation reagent (Figure 3, 4).

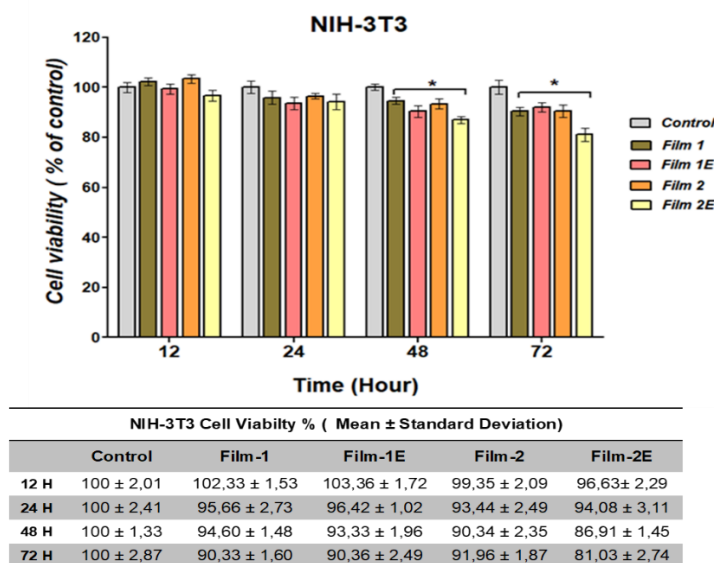
In Figure 3 the table shows the % cell viability rate of HEK-293T cell, and the graphs show the control and ODF formulation-treated cell viability ratio. As a result of 12 hours of incubation with ODF formulations in the HEK-293T cell line, cell viability in all groups was similar to control group cells ( $p > 0.05$ ). After 24 hours of incubation, the cell viability of the empty ODF-1 and -2 treated groups was identical to the control. It was observed that ODF-1E and -2E formulations caused a slight decrease in cell viability ( $92.30\% \pm 1.35$  and  $94.08\% \pm 3.11$ , respectively). As a result of the 48- and 72-hour incubation carried out to determine the long-term effects of the formulations on the cells, it was determined that the formulations except the empty ODF-1 group caused a decrease in HEK-293T cell viability compared to the control ( $p < 0.05$ ) (Figure 4). In addition, the results obtained at the end of the 72-hour incubation period showed that the viability of the cells incubated with the ODF-1 formulation was significantly higher than the other tested formulation ( $p < 0.05$ ). On the other hand, no cytotoxic effect of the empty ODF-1 formulation was found neither towards HEK-293T cells nor towards NIH-3T3 cells at any time tested ( $p > 0.05$ ).

Figure 3 shows the cell viability rate of NIH-3T3 cells, and the graphs show the comparison of cell viability between control and ODF formulation-treated cells. After 12- and 24-hour incubations, cell viability was determined similar to control in all formulations tested. Controversially, it was observed that all tested formulations caused a slight but significant decrease in NIH-3T3 cells. In

contrast, all formulations tested were observed to cause a slight but significant reduction in NIH-3T3 cell viability after 48 and 72 hours of testing ( $p>0.05$ ). Furthermore, results also showed that cell viability was still almost 90% compared to control cells (Figure3).



**Figure 3.** Evaluation of the cytotoxic potential of ODF formulations on HEK-293T cell.



**Figure 4.** Evaluation of the cytotoxic potential of ODF formulations on NIH-3T3 cell.

### Stability Studies

The product must maintain its optimum properties over time, thus ensuring the physical and chemical stability of the formulation. These properties depend on the formulation structure, production process and ambient conditions. Stability studies of ODFs were carried out as per ICH guidelines, and the formulation was stable after 90 days at  $25\pm 0.5^\circ\text{C}/60\pm 5\%$  relative humidity and  $40\pm 0.5^\circ\text{C}/75\pm 5\%$  relative humidity. According to the stability results, there was no meaningful change on followed stability parameters of ODFs after 3 months.

In the current study, we aimed to develop RM-loaded ODFs for PD. Development of the ODFs of RM could be a preferable alternative to the conventional oral route improving the quality of life and patient acceptability. ODF formulation of RM was prepared using PEO by solvent casting method using GLY as a plasticizer. All the formulations were evaluated for various parameters such as appearance, tensile strength, weight uniformity, thickness, surface pH, drug content swelling index, *in vitro* drug release and stability. F1 and F2 were smooth and flexible with an opaque appearance. The weights and thicknesses of the ODFs were found to be uniform. In addition, when homogeneity is evaluated in terms of drug content, the low SD value shows that the prepared ODFs are homogeneous.

The pH values were found to be around 6.8 that comply with the range of buccal mucosa. Formulations exhibited good swelling behavior and higher tensile strength due to their elastic behavior. All the formulations were subjected to *in vitro* drug release study which were carried out using USP apparatus II. The above study concluded that possibilities of the making of mucoadhesive ODFs for RM which will be more effective in a short time and having satisfactory properties which may provide increased therapeutic efficacy and patient compliance. The findings obtained from the results of the cytotoxicity experiment using two different healthy cell lines reveal that both F1 and F2 formulations are suitable for non-toxic drug-carrier formulations. Moreover, our results strongly indicate that the active ingredient RM prepared in F1 and F2 ODFs may be significantly masking the potential side effects of RM on healthy tissue during treatment. After all, in the light of all data in this study, we think that RM loaded ODFs can be considered as a potential and viable approach for successful treatment of PD soon.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (grant TUBITAK-219S545). The authors would also like to thank the Ege University Pharmaceutical Sciences Research Center (FABAL) for enabling us to use their laboratory instruments.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: M.G., F.A.K., Ö.Ö., S.Y.K.; Design: M.G., F.A.K., Ö.Ö., S.Y.K.; Control: M.G., F.A.K., Ö.Ö., S.Y.K.; Sources: M.G., G.T., A.D., F.A.K., Ö.Ö., S.Y.K.; Materials: M.G., G.T., A.D., F.A.K., S.Y.K.; Data Collection and/or Processing: M.G., G.T., A.D., F.A.K., Ö.Ö., S.Y.K.; Analysis and/or Interpretation: M.G., F.A.K., Ö.Ö., S.Y.K.; Literature Review: M.G., F.A.K., S.Y.K.; Manuscript Writing: M.G., F.A.K., Ö.Ö., S.Y.K.; Critical Review: M.G., G.T., A.D., F.A.K., Ö.Ö., S.Y.K.; 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. Pfeiffer, R.F. (2016). Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 22, S119-S122. [\[CrossRef\]](#)
2. Himanshu, Bhaskar R., Sharma N., Mehta M., Singh A., Yashwant, Yadav N.S., Khatik G.L., Verma S. (2017). Development and evaluation of buccoadhesive film of ropinirole hydrochloride for the treatment of Parkinson's disease. *International Journal of Drug Delivery Technology*, 7, 106-112. [\[CrossRef\]](#)
3. Rabey J.M., Sagi I., Huberman M., Melamed E., Korczyn A., Giladi N., Inzelberg R., Djaldetti R., Klein C., Berecz G. (2000). Rasagiline mesylate, a new MAO-B inhibitor for the treatment of Parkinson's disease: A double-blind study as adjunctive therapy to levodopa. *Clinical Neuropharmacology*, 23, 324-330. [\[CrossRef\]](#)
4. Bukka, R., Prakasam, K., Patel, C.D. (2010). Preparation and evaluation of intraoral drug delivery system for rasagiline mesylate. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 2, 294-301.

5. Hoffmann, E.M., Breitenbach, A., Breitreutz, J. (2011). Advances in orodispersible films for drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8(3), 299-316. [\[CrossRef\]](#)
6. Irfan, M., Rabel, S., Bukhtar, Q., Qadir, M.I., Jabeen, F., Khan, A. (2016). Orally disintegrating films: A modern expansion in drug delivery system. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(5), 537-546. [\[CrossRef\]](#)
7. Ravi, P.R., Aditya, N., Cherian, L., Patil, S. (2013). LC method for determination of rasagiline mesylate in different plasma matrices and its application to oral pharmacokinetic study in rabbits. *Journal of Chromatographic Science*, 51(1), 1-7. [\[CrossRef\]](#)
8. Tomar, A., Sharma K., Chauhan N.S., Mittal, A., Bajaj U. (2012). Formulation and evaluation of fast dissolving oral film of dicyclomine as potential route of buccal delivery. *International Journal of Drug Development and Research*, 4(2), 408-417.
9. Hosny K.M., El-Say K.M., Ahmed O.A. (2016). Optimized sildenafil citrate fast orodissolvable film: a promising formula for overcoming the barriers hindering erectile dysfunction treatment. *Drug Delivery*, 23(1), 355-361. [\[CrossRef\]](#)
10. Bahri-Najafi, R., Tavakoli, N., Senemar, M., Peikanpour, M. (2014). Preparation and pharmaceutical evaluation of glibenclamide slow release mucoadhesive buccal film. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9(3), 213-223.
11. Mashru R.C., Sutariya V.B., Sankalia M.G., Parikh P.P. (2005). Development and evaluation of fast-dissolving film of salbutamol sulphate. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 31(1), 25-34. [\[CrossRef\]](#)
12. Çoban G., Aydın-Kose, F. (2019). Synthesis, biological evaluations and molecular modelling studies of novel indolin-2-ones designing as FGFR inhibitors. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(7), 952-967. [\[CrossRef\]](#)
13. Cheaburu-Yilmaz C.N., Yilmaz O., Aydın-Kose F., Bibire N. (2019). Chitosan-graft-poly (N-isopropylacrylamide)/PVA cryogels as carriers for mucosal delivery of voriconazole. *Polymers*, 11(9), 1432. [\[CrossRef\]](#)
14. Nair A.B., Shah J., Jacob S., Al-Dhubiab B.E., Patel V., Sreeharsha N., Shinu P. (2021). Development of mucoadhesive buccal film for rizatriptan: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *Pharmaceutics*, 13(5), 728. [\[CrossRef\]](#)
15. Nair A.B., Al-Dhubiab B.E., Shah J., Jacob S., Saraiya V., Attimarad M., SreeHarsha N., Akrawi S.H., Shehata T.M. (2020). Mucoadhesive buccal film of almotriptan improved therapeutic delivery in rabbit model. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28(2), 201-209. [\[CrossRef\]](#)
16. Szabó P., Daróczy T.B., Tóth G., Zelkó R. (2016). *In vitro* and *in silico* investigation of electrospun terbinafine hydrochloride-loaded buccal nanofibrous sheets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 131, 156-159. [\[CrossRef\]](#)
17. Jovanović M., Tomić N., Cvijić S., Stojanović D., Ibric S., Uskoković P. (2021). Mucoadhesive gelatin buccal films with propranolol hydrochloride: Evaluation of mechanical, mucoadhesive, and biopharmaceutical properties. *Pharmaceutics*, 13(2), 273. [\[CrossRef\]](#)
18. Singh T.P., Singh R.K., Shah J.N., Mehta T.A. (2014). Mucoadhesive bilayer buccal patches of Verapamil hydrochloride: Formulation development and characterization. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(4), 234-241.
19. Rençber S., Karavana S.Y., Yilmaz F.F., Eraç B., Nenni M., Gurer-Orhan H., Limoncu M.H., Güneri P., Ertan G. (2019). Formulation and evaluation of fluconazole loaded oral strips for local treatment of oral candidiasis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 49, 615-621. [\[CrossRef\]](#)
20. Arslan-Azizoglu G., Tuncay-Tanriverdi S., Aydın-Kose F., Ballar-Kirmizibayrak P., Ozer O. (2017). Dual-Prevention for UV-Induced Skin Damage: Incorporation of Melatonin-Loaded Elastic Niosomes into Octyl Methoxycinnamate Pickering Emulsions. *AAPS PharmSciTech*, 18, 2987-2998. [\[CrossRef\]](#)



# REBOKSETİN'İN DİYABETİK SIÇANLARDA BOZULMUŞ DAVRANIŞ PARAMETRELERİ ÜZERİNDEKİ YARARLI ETKİLERİ

## BENEFICIAL EFFECTS OF REBOXETINE ON IMPAIRED BEHAVIORAL PARAMETERS OF DIABETIC RATS

Nazlı TURAN YÜCEL<sup>1\*</sup> , Ümmühan KANDEMİR<sup>2</sup> , Umut İrfan ÜÇEL<sup>3</sup> ,  
Özgür Devrim CAN<sup>1</sup> , Ümide DEMİR ÖZKAY<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Ana Bilim Dalı, 26470, Eskişehir, Türkiye

<sup>2</sup>Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Ana Bilim Dalı, 26470, Eskişehir,  
Türkiye

<sup>3</sup>Bayburt Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, 69000, Bayburt, Türkiye

### ÖZ

**Amaç:** Diyabetik hastalarda duygu-durum hastalıklarının ve kognitif bozukluk insidansının genel popülasyona oranla daha yüksek olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, klinikte antidepresan etkinliği için reçete edilen reboksetin'in sıçanlarda diyabet ile indüklenen davranışsal ve bilişsel değişiklikler üzerine etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Sıçanlarda deneysel diyabet modeli 50 mg/kg tek doz streptozotosin enjeksiyonu (i.v.) ile oluşturulmuştur. Reboksetin tedavisine diyabetik komplikasyonların oluşması için 4 hafta beklendikten sonra başlanmıştır. Deney hayvanlarının depresyon ve anksiyete düzeyleri sırasıyla modifiye zorlu yüzme ve yükseltilmiş artı şekilli labirent testleri ile araştırılmış; kognitif performansları ise Morris su tankı ve pasif sığınma testleri ile değerlendirilmiştir. Hayvanların motor aktiviteleri de aktivite kafesi ve Rota-rod testleri ile incelenmiştir.

**Sonuç ve Tartışma:** Deneyler sonucunda, diyabetik sıçanların depresyon ve anksiyete düzeylerinin yükseldiği ve bilişsel performanslarının zayıfladığı belirlenmiştir. İki hafta süre ile uygulanan reboksetin tedavisi (8 ve 16 mg/kg) diyabetik sıçanların yüksek depresyon ve anksiyete düzeylerini azaltırken, zayıflamış olan bilişsel performanslarını kayda değer ölçüde güçlendirmiştir. Elde edilen bulgular reboksetin'in diyabete bağlı olarak ortaya çıkan davranışsal ve bilişsel bozuklukların tedavisinde terapötik bir potansiyele sahip olabileceğine işaret etmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Anksiyete, depresyon, Diabetes mellitus, kognisyon, reboksetin

\* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Nazlı Turan Yücel  
e-posta / e-mail: nazlituran@anadolu.edu.tr, Tel. / Phone: +902223350580/3751

Gönderilme / Submitted : 27.07.2022

Kabul / Accepted : 07.10.2022

Yayınlanma / Published : 20.01.2023

## ABSTRACT

**Objective:** *The incidence of emotional and cognitive disorders are higher in diabetic patients with respect to the general population. In this study, it was aimed to investigate the efficacy of reboxetine, a clinically prescribed drug for its antidepressant effect, on behavioral and cognitive alterations caused by diabetes in rats.*

**Material and Method:** *An experimental diabetes model in rats was induced with a single 50 mg/kg injection of streptozotocin (i.v.). Reboxetine treatment was started 4 weeks after the induction of diabetes in order to observe diabetic complications. Depression and anxiety levels of experimental animals were investigated by modified forced swimming and elevated plus-maze tests, respectively; cognitive performances were evaluated by Morris water-maze and passive avoidance experiments. The motor activities of the animals were also examined with the activity cage and Rota-rod tests.*

**Result and Discussion:** *Obtained results indicated that the depression and anxiety levels of diabetic rats were increased and their cognitive performances were weakened. Reboxetine treatment (8 and 16 mg/kg) for two weeks reduced the elevated depression and anxiety levels in diabetic rats, while significantly improving their weakened cognitive performance. The findings indicated that reboxetine might possess a therapeutic potential for the cure of behavioral and cognitive impairments concomitant with diabetes.*

**Keywords:** *Anxiety, cognition, depression, Diabetes mellitus, reboxetine*

## GİRİŞ

*Diabetes mellitus* insülin salıverilmesi ve/veya işlevlerindeki bozukluğa bağlı olarak ortaya çıkabilen; karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmalarında problemlerin ve süregelen hipergliseminin gözlemlendiği metabolik bir rahatsızlıktır [1]. Diyabet hipoglisemi koması, diyabetik ketoasidoz, non-ketotik hiperozmolar durum ve laktik asidoz koması gibi, hastalarda ölümle sonuçlanabilen akut komplikasyonlara neden olabilmektedir [2,3]. Bu hastalık ayrıca, uzun dönem metabolik aksaklıklardan kaynaklı olarak çeşitli organların disfonksiyonu ile karakterize kronik komplikasyonlara da yol açabilmektedir [4]. Diyabetin kronik komplikasyonları makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlar olarak sınıflandırılmaktadır. Kardiyovasküler hastalıklar, periferik damar hastalığı, serebrovasküler hastalıklar, makrovasküler; nöropati, nefropati ve retinopati ise mikrovasküler komplikasyonlar arasındadır [5].

*Diabetes mellitus*'un santral sinir sisteminde (SSS) yapısal ve işlevsel bozukluklara neden olduğu gösterilmiştir. *Diabetes mellitus*'un SSS ile ilişkili komplikasyonları bazı araştırmacılarca "diyabetik ensefalopati" olarak tanımlanmıştır [6,7]. Birçok çalışma diyabetik hastalarda nöro-psikiyatrik komplikasyonların gelişimini insülin'in disfonksiyonu ve buna bağlı olarak ortaya çıkan hiperglisemi ile ilişkilendirmiştir [7,8]. Diğer yandan, yoğun insülin uygulamasına maruz kalan tip-1 diyabetik hastalardaki hipoglisemik epizodların da SSS hasarına yol açabileceği bildirilmiştir [9]. Kronik hiperglisemi ve insülin disfonksiyonuna bağlı olarak görülen komplikasyonlar 'primer diyabetik ensefalopati'; diyabetik vasküler hastalıklar veya yoğun insülin uygulaması ile indüklenen hipoglisemi epizodlarına bağlı olarak meydana gelen komplikasyonlar ise 'sekonder diyabetik ensefalopati' olarak adlandırılmıştır [10].

*Diabetes mellitus*'un SSS komplikasyonları sıklıkla deneysel diyabet modelleri kullanılarak araştırılmaktadır [6,10]. Tip-1 diyabet modeli oluşturulmuş deney hayvanları ile yapılan çalışmaların sonuçları, bu hayvanların beyinlerinde morfolojik ve elektrofizyolojik bozulmalar meydana geldiğini; nöron yoğunluklarında, nörotransmitter düzeylerinde, apoptoz aktivitesinde ve kognitif işlevlerde önemli değişimler görüldüğünü bildirmiştir [6,10]. Deney hayvanlarının davranış parametrelerindeki değişimlerin incelendiği çalışmalar, diyabetli kemirgenlerin, yeni ortamda daha fazla grooming (süslenme) hareketi yaptıklarına, daha az sosyal etkileşim gösterdiklerine, psikofarmakolojik testlerde depresyon ve anksiyete benzeri davranışlar sergilediklerine ve spontan lokomotor aktivitelerinin değiştiğine işaret etmiştir [11-13].

Diğer yandan, diyabetik hayvanların bilişsel işlevlerinin de zayıfladığı bildirilmiştir [14]. Bu hayvanlarda çevre ile ilgili iç uyarıların oluşturulması, dikkat, bilginin depolanması/ yorumlanması ve problem çözme benzeri bilişsel işlevlerin bozulduğu rapor edilmiştir [6,15]. Nitekim tip-1 diyabet

hastalarında da yeni bilgi öğrenme, hatırlama ve problem çözme gibi kognitif işlevlerin genel popülasyona oranla daha zayıf olduğu gösterilmiştir [16]. Benzer şekilde tip-2 diyabetli hastalarda özellikle yeni bilgi oluşturmayı ve depolamayı gerektiren kompleks bilişsel işlevlerde bozukluklar gözlemlendiği; kompleks psikomotor aktivitenin azaldığı, soyut yargılamanın zayıfladığı ve demans riskinin yükseldiği bildirilmiştir [6,17].

Günümüze kadar yapılan çalışmalarla diyabetin hastalarda neden olduğu davranışsal ve bilişsel bozukluklar aydınlatılmış olmasına rağmen, diyabetik komplikasyonların tedavisinde çoklu yarar sağlayabilecek spesifik bir ilaç bulunmamaktadır. Bu nedenle, diyabet kaynaklı komplikasyonların tedavisi için yeni ajanların geliştirilmesi veya günümüzde kullanılan ilaçların söz konusu endikasyonlar için repozisyonu çalışmaları önem kazanmıştır. Reboksetin duygudurum, dikkat, öğrenme ve bellek fonksiyonlarında kritik rol oynadığı bilinen bir nörotransmitter olan noradrenalin'in santral nörotransmisyonunu artırarak gerek emosyon gerekse kognisyon üzerine olumlu etkiler gösterdiği bilinen antidepressan bir ilaçtır [18-22]. Literatürde reboksetin'in diyabetik deneklerde plazma glukoz seviyeleri, nöropatik ağrı parametreleri ve barsak mikrobiyomu üzerine etkilerinin araştırıldığı bazı çalışmalar bulunmakla birlikte, bu antidepressanın diyabete bağlı olarak gelişen depresyon, anksiyete ve öğrenme/bellek zayıflıkları üzerine etkileri daha önce araştırılmamıştır [23-25]. Bu nedenle bu çalışmada, reboksetin'in, deney hayvanlarında diyabet ile indüklenen emosyonel ve bilişsel bozukluklar üzerine farmakolojik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Deney Hayvanları

Deneyler 250-300 g ağırlığında erişkin, erkek Sprague-Dawley sıçanlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sıçanlar yeterli derecede havalandırılan, 12 saat karanlık /12 saat aydınlık döngüsüne (8<sup>00</sup>-20<sup>00</sup>) sahip, 24 ± 1°C sıcaklıktaki odalarda üretilmiş ve barındırılmıştır. Deneylerde kullanılan hayvanlar standart yem ile beslenmişlerdir.

### Kullanılan Kimyasal Maddeler

Reboksetin (Edronax<sup>®</sup>, Pfizer, NY, ABD) ticari olarak temin edilmiştir. Streptozotosin (STZ) ve pirasetam Sigma-Aldrich'ten (St Louis, MO, ABD); trisodyum sitrat ve sitrik asit Merck'ten (Darmstadt, Almanya), serum fizyolojik ise Adeka'dan (Samsun, Türkiye) alınmıştır.

### Deneyel Diyabet Modelinin Oluşturulması

Deneyel diyabet modeli oluşturmak amacı ile STZ, 0.1 M, pH=4.5 sitrat tamponu içerisinde hazırlanarak deney hayvanlarının kuyruk venlerinin içine (*i.v.*) 50 mg/kg dozda uygulanmıştır. Hipoglisemik şok gelişimini önlemek üzere, STZ uygulamalarından sonra sıçanlara suluklar içerisinde 5 mmol/L glukoz solüsyonu verilmiştir [26].

Enjeksiyondan 72 saat sonra, 12 saat aç bırakılmış deney hayvanlarının kuyruklarından kan örnekleri alınmış ve açlık plazma glukoz düzeyleri Accu-Chek<sup>®</sup> Performa Nano (Roche, Basel, İsviçre) cihazı ile ölçülmüştür [27,28]. Ölçüm değeri 300 mg/dl'den yüksek bulunan deney hayvanları diyabetik olarak kimliklendirilmiştir [29].

Diyabet modeli başarı ile oluşturulmuş sıçanlarda kronik komplikasyonların oluşabilmesi için 4 hafta süre ile beklenmiş ve ilaç tedavilerine bu sürenin sonunda başlanmıştır. Deneylerin bitiminde tüm hayvanların açlık plazma glukoz düzeyleri ölçülerek kaydedilmiştir.

### İlaç Uygulamaları

Reboksetin sıçanlardaki etkin dozları olan 8 ve 16 mg/kg dozlarda kullanılmış ve hayvanlara oral yolla 14 gün süre ile uygulanmıştır [24]. Normoglisemik ve diyabetik kontrol gruplarına da, reboksetin'in çözücüsü olarak kullanılan serum fizyolojik solüsyonu oral yolla, aynı süre boyunca uygulanmıştır.

Spontan lokomotor aktivite, motor koordinasyon, modifiye zorlu yüzme ve yükseltilmiş artı labirent teslerinin hepsinin aynı deney hayvanları ile yapılması uygun olmadığından, bu testler için 2 ayrı deney seti (Set 1: önce yükseltilmiş artı labirent testinin sonra Rota-rod deneylerinin yapıldığı grup



ve Set 2: önce aktivite kafesi ölçümlerinin sonra modifiye zorlu yüzme testinin yapıldığı grup) oluşturulmuştur.

Morris su testi ve pasif sakınma teslerinin de aynı hayvanlarda yapılması uygun olmadığından, bu testler için de 2 ayrı deney seti oluşturulmuştur.

Her bir deney seti serum fizyolojik uygulanan normoglisemik (Kontrol), serum fizyolojik uygulanan diyabetik (DM), 8 mg/kg reboksetin uygulanan diyabetik (DM+RBX-8) ve 16 mg/kg reboksetin uygulanan diyabetik (DM+RBX-16) deney gruplarından oluşmuştur. Diğer yandan öğrenme ve bellek parametrelerinin değerlendirildiği testler için standart ilaç olarak pirasetam (300 mg/kg, *p.o.*) verilen bir başka grup daha oluşturulmuştur (DM+PRS) [30]. Her deney grubunda 8 adet sıçan yer almaktadır.

## Davranış Deneyleri

### Aktivite Kafesi Ölçümleri

Sıçanların hem yatay hem de dikey yönlerdeki lokomotor aktivitelerinin sayıları “aktivite kafesi” cihazı ile (Ugo Basile, 7420, Varese, İtalya) 10 dakika boyunca kaydedilmiştir [31].

### Rota-Rod Ölçümleri

Deney hayvanlarının motor aktivitelerindeki olası bir değişiklik Rota-Rod testi (Ugo Basile, 47700, Varese, İtalya) ile değerlendirilmiştir. Testten önce, ardışık üç gün boyunca antrenman (training) yapılmış ve sıçanlar dönen bir milin üzerinde yürümeyi öğrendikten sonra test fazına geçilmiştir. Test fazında hayvanlar 8 rpm sabit hızda dönen milin üzerine yerleştirilmiş ve düşme süreleri kaydedilmiştir [32].

### Modifiye Zorlu Yüzme Testi

Deney hayvanlarının depresyon-benzeri davranışları modifiye zorlu yüzme testi ile değerlendirilmiştir. Test için, 30 cm çapta ve 50 cm yükseklikte; 40 cm su ile doldurulmuş bir silindir kullanılmıştır. Deneylerden 24 saat önce sıçanlar düzenekte yüzdürülerek antrenman (training) yapılmıştır. Test aşamasında deney hayvanlarının suyun içinde 5 s'den uzun süren hareketsizlik (immobilite), yüzme (su yüzeyinde yatay yöndeki hareketler) ve tırmanma (ön-ayaklar ile silindirin kenarında yukarı doğru hareketler) davranışlarının süreleri bir kronometre yardımı ile 5 dakika süresince kaydedilmiştir [31,33].

### Yükseltilmiş Artı Şekilli Labirent Testi

Deney hayvanlarının anksiyete-benzeri davranışları yükseltilmiş artı şekilli labirent testi ile araştırılmıştır. Yerden 50 cm yukarıya konumlandırılan düzenek, 2 açık kolu (uzunluk: 50 cm; genişlik: 10 cm), iki kapalı kolu (uzunluk: 50 cm; genişlik: 10 cm; yükseklik: 40 cm) ve bir merkez bölgesi (10x10 cm<sup>2</sup> boyutlarında bir kare) bulunan “artı” şeklinde bir labirent’den (Ugo-basile, 40142, Varese, İtalya) ibarettir.

Test sırasında, deney hayvanlarının kapalı ve açık kollara girme sayıları ve bu alanlarda geçirdikleri süreler bir kronometre yardımıyla 10 dakika süre ile kaydedilmiştir. Sıçanların anksiyete davranışlarını değerlendirmek üzere; her bir hayvan için açık kollara giriş sayılarının yüzdesi (%AKGS) ve açık kollarda geçirilen zamanın yüzdesi (%AKGZ) aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır [34]:

$$\% \text{ AKGS} = \frac{\text{Açık kola giriş sayısı}}{\text{Her iki kola toplam giriş sayısı}} \times 100$$

$$\% \text{ AKGZ} = \frac{\text{Açık kolda geçirilen süre}}{\text{Her iki kolda geçirilen toplam süre}} \times 100$$

### **Morris Su Tankı Testi**

Sıçanların uzamsal öğrenme ve bellek fonksiyonları Morris su tankı cihazı (Ugo-Basile, 40185, Varese, İtalya) kullanılarak değerlendirilmiştir [35]. Testler süresince kaçış platformunun yerini gizlemek üzere tank içerisindeki su, süt tozu ile opak hale getirilmiştir.

Deney hayvanları 5 ardışık gün boyunca deneye alınmışlardır. Deneyin ilk 4 günü, 5 dakika aralıklarla 4 denemeye tabi tutulan hayvanların platformu bulmalarına kadar geçen süre (kaçış süresi) kronometre ile ölçülerek kaydedilmiştir. Hayvana kaçış platformunu keşfetmesi için tanınan süre 120 s (cut-off)'dir. Bu süre içerisinde platformu bulabilen sıçanların burada 20 s süre ile kalmasına izin verilmiştir. Platformu tanınan süre içinde bulamayan hayvanların platformu bulmalarına manuel olarak yardımcı olunmuştur.

Deneyin beşinci gününde platform kaldırılmış ve bu kadran "hedef kadran" olarak belirlenmiştir. Daha sonra tank içerisine bırakılan sıçanın 120 saniye boyunca hedef kadranda geçirdiği süre kaydedilmiştir [35].

### **Pasif Sakınma Testi**

Emosyonel belleğin değerlendirilmesi amacıyla pasif sakınma cihazı (Ugo Basile, 7551, Verase, İtalya) kullanılmıştır [36]. Deney hayvanlarına önce deneme eğitimi uygulanmıştır. Bu amaçla aydınlık bölme bırakılmış olan sıçanların; bölmeler arasındaki kapının 30 saniye sonra açılması ile karanlık alana serbestçe geçmeleri sağlanmıştır. Eğitimden 15 dakika sonra gerçekleştirilen edinim denemelerinde sıçanlar aydınlık bölme yerleştirilmiş ve cihazın kapısı açıldıktan sonra karanlık bölme geçiş süreleri ilk geçiş süresi (İGS) olarak kaydedilmiştir. Aydınlık bölmeden karanlık alana 300 saniye içerisinde geçmeyen hayvanlar deneylerden elimine edilmiştir. Sıçanlar karanlık bölme tamamen girdiklerinde kapı otomatik olarak kapanmış ve hayvana cihazın ızgara zemini aracılığı ile 3 s süre ile 0.5 mA elektrik şoku uygulanmıştır. Edinim denemelerinden 24 saat sonra bellek denemeleri gerçekleştirilmiş ve sıçanların karanlık bölme giriş süreleri ikinci giriş süresi (İkGS) olarak kaydedilmiştir. Karanlık alana girmesi için sıçanlara maksimum 300 saniye süre tanınmıştır.

### **İstatiksel Analiz**

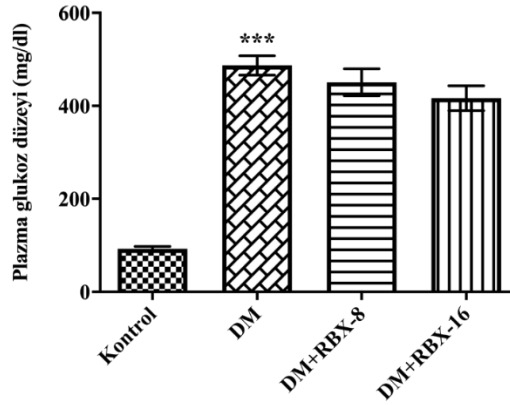
İstatiksel analizler GraphPad Prism ver. 8.4.3 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) programı ile yapılmıştır. Morris su tankı testinin ilk 4 günü kaydedilen kaçış süresi değerleri çift yönlü varyans analizi (ANOVA)-tekrarlı ölçüm testi ve takiben Bonferroni çoklu karşılaştırma testi yapılarak; diğer veriler ise tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi yapılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar ortalama±ortalamanın standart hatası olarak sunulmuş ve  $p<0.05$  değeri anlamlı kabul edilmiştir.

## **SONUÇ ve TARTIŞMA**

### **Reboksetin Uygulamasının Plazma Glukoz Değerleri Üzerine Etkileri**

Serum fizyolojik verilen normoglisemik (kontrol) ve serum fizyolojik, 8 ve 16 mg/kg reboksetin uygulanan diyabetik sıçanların plazma glukoz düzeyleri Şekil 1'de gösterilmiştir [ $F(3,28)=65.77$ ,  $p<0.001$ ].

Tukey testi sonuçları, tedavi edilmeyen diyabetik hayvanların plazma glukoz düzeylerinin normoglisemik kontrol hayvanlarının plazma glukoz düzeylerine göre önemli ölçüde yükseldiğini ortaya koymuştur. 8 ve 16 mg/kg reboksetin tedavisi diyabetik sıçanların artmış plazma glukoz düzeyleri üzerinde herhangi bir değişime sebep olmamıştır (Şekil 1).

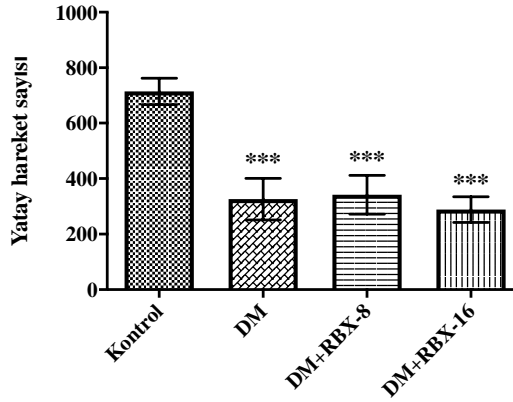


**Şekil 1.** Normoglisemik (Kontrol), diyabetik (DM), 8 mg/kg (DM+RBX-8) ve 16 mg/kg reboksetin uygulanan diyabetik sıçanların (DM+RBX-16) plazma glukoz düzeyleri. \*\*\* $p < 0.001$ : Kontrol grubuna göre farklılık. Tek yönlü ANOVA, post hoc Tukey HSD,  $n=8$ .

## Reboksetin Uygulamasının Motor Aktivite Parametreleri Üzerine Etkileri

### Aktivite Kafesi Testine İlişkin Bulgular

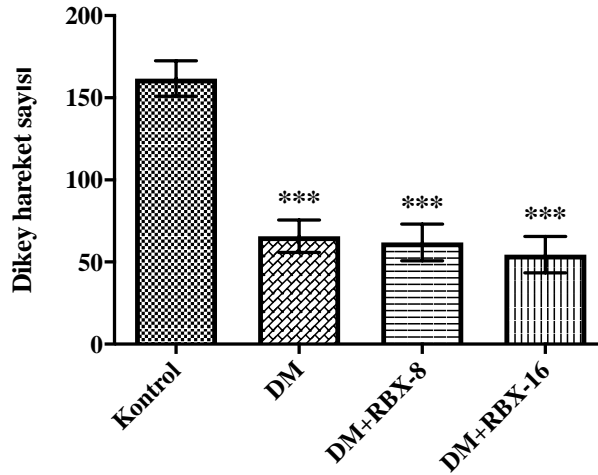
Serum fizyolojik verilen normoglisemik (kontrol) ve serum fizyolojik, 8 ve 16 mg/kg reboksetin uygulanan diyabetik sıçanların aktivite kafesi testinde ölçülen yatay hareket sayıları Şekil 2’de gösterilmiştir [ $F(3,28)=10.63$ ,  $p < 0.001$ ].



**Şekil 2.** Normoglisemik (Kontrol), diyabetik (DM), 8 mg/kg (DM+RBX-8) ve 16 mg/kg reboksetin uygulanan diyabetik sıçanların (DM+RBX-16) aktivite kafesi testinde ölçülen yatay hareket sayıları. \*\*\* $p < 0.001$ : Kontrol grubuna göre farklılık. Tek yönlü ANOVA, post hoc Tukey HSD,  $n=8$ .

Tukey testi sonuçları, tedavi edilmeyen diyabetik hayvanların yatay yöndeki hareket sayılarının normoglisemik kontrol hayvanlarına göre önemli ölçüde azaldığını ortaya koymuştur. 8 ve 16 mg/kg reboksetin tedavisi diyabetik sıçanların azalan lokomotor aktivite sayıları üzerinde herhangi bir değişime sebep olmamıştır (Şekil 2).

Şekil 3’de serum fizyolojik verilen normoglisemik (kontrol) ve serum fizyolojik, 8 ve 16 mg/kg reboksetin uygulanan diyabetik sıçanların aktivite kafesi testinde kaydedilen dikey hareket sayıları gösterilmiştir [ $F(3,28)=22.23$ ,  $p < 0.001$ ].



**Şekil 3.** Normoglisemik (Kontrol), diyabetik (DM), 8 mg/kg (DM+RBX-8) ve 16 mg/kg reboksetin uygulanan diyabetik sıçanların (DM+RBX-16) aktivite kafesi testinde ölçülen dikey hareket sayıları. \*\*\* $p < 0.001$ : Kontrol grubuna göre farklılık. Tek yönlü ANOVA, post hoc Tukey HSD,  $n=8$ .

Tukey testi sonuçları, tedavi edilmeyen diyabetik hayvanların dikey yöndeki hareket sayılarının normoglisemik kontrol hayvanlarına oranla anlamlı ölçüde azaldığına işaret etmiştir. 8 ve 16 mg/kg reboksetin tedavisi, diyabetik hayvanların yatay yöndeki lokomotor aktivite sayılarına benzer şekilde, dikey yöndeki lokomotor aktivite sayıları üzerinde de anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 3).

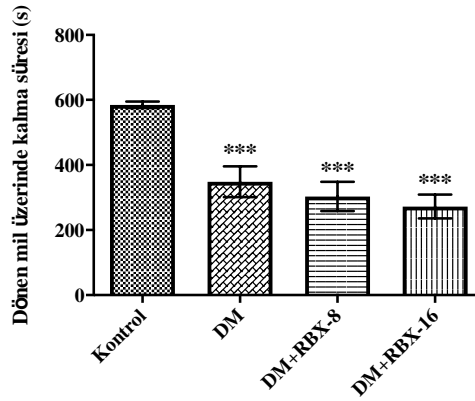
### Dönen Mil Testine İlişkin Bulgular

Serum fizyolojik verilen normoglisemik (kontrol) ve serum fizyolojik, 8 ve 16 mg/kg reboksetin verilen diyabetik sıçanların motor koordinasyon parametrelerinin değişimi Şekil 4'te gösterilmiştir [ $F(3,28)=14.14$ ,  $p < 0.001$ ].

Tukey testi sonuçları, tedavi edilmeyen diyabetik hayvanların dönen mil üzerinde kalma sürelerinin, normoglisemik kontrol hayvanlarına göre anlamlı ölçüde kısaldığını göstermiştir. 8 ve 16 mg/kg reboksetin tedavisi diyabetik sıçanların dönen mil üzerinde kalma süreleri üzerinde kayda değer bir değişikliğe sebep olmamıştır (Şekil 4).

Diyabetik hayvanların yatay (Şekil 2) ve dikey (Şekil 3) yönlerdeki lokomotor aktivite sayılarının azalması ve ayrıca, bu hayvanların dönen milin üzerinde kalma sürelerinin de kısalmış olması (Şekil 4) diyabetin, hayvanların motor performanslarını bozucu yönde etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu çalışma kapsamında elde edilen bulgular diyabetik hayvanlarda lokomotor aktivitenin azaldığını ve motor koordinasyonun bozulduğunu bildiren önceki çalışmaların sonuçlarını desteklemektedir [31,32].

Diyabetik hayvanlarda lokomotor aktivitenin azalması, bazal gangliyonlarda dopamin sentez, salınım ve turnover'ının azalması ve postsinaptik reseptör duyarlılığının zayıflaması ile ilişkilendirilmiştir [38,39]. Ayrıca, motor nöronlarda iletinin yavaşlaması, kortikospinal motor disfonksiyon, periferik nöropati ve iskelet kası disfonksiyonlarının da lokomotor aktivitede görülen azalmaya katkıda bulunabileceği ileri sürülmüştür [40]. Diğer yandan, bu çalışmada, reboksetin tedavisinin, diyabetik hayvanların spontan lokomotor aktivite sayılarında (Şekil 2 ve 3) ve dönen milin üzerinde kalma sürelerinde (Şekil 4) herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı gösterilmiştir. Bu bulgu reboksetin'in bu çalışmada ortaya koyulan farmakolojik etkilerinin, hayvanların motor performanslarındaki herhangi bir değişiklikten etkilenmediğini ortaya koymuş olması açısından önemlidir.

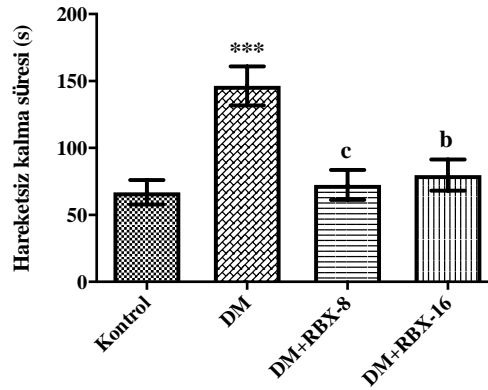


**Şekil 4.** Normoglisemik (Kontrol), diyabetik (DM), 8 mg/kg (DM+RBX-8) ve 16 mg/kg reboksetin uygulanan diyabetik (DM+RBX-16) sıçanların dönen milin üzerinde kalma süreleri. \*\*\* p<0.001: Kontrol grubuna göre farklılık. Tek yönlü ANOVA, post hoc Tukey HSD, n=8.

## Reboksetin Uygulamasının Depresyon ve Anksiyete Parametreleri Üzerine Etkileri

### Modifiye Zorlu Yüzme Testine İlişkin Bulgular

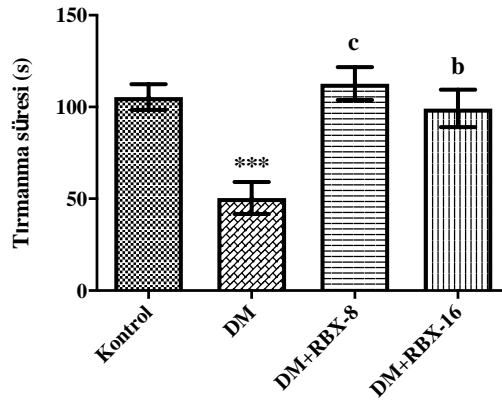
Serum fizyolojik verilen normoglisemik (kontrol) ve serum fizyolojik, 8 ve 16 mg/kg reboksetin verilen diyabetik sıçanların modifiye zorlu yüzme testinde kaydedilen hareketsizlik süreleri Şekil 5'te gösterilmiştir [F(3,28)=9.817, p<0.001].



**Şekil 5.** Normoglisemik (Kontrol), diyabetik (DM), 8 mg/kg (DM+RBX-8) ve 16 mg/kg reboksetin uygulanan diyabetik (DM+RBX-16) sıçanların modifiye zorlu yüzme testinde ölçülen hareketsiz kalma süreleri. \*\*\* p<0.001: Kontrol grubuna göre farklılık; <sup>b</sup>p<0.01, <sup>c</sup>p<0.001: Diyabet grubuna göre farklılık. Tek yönlü ANOVA, post hoc Tukey HSD, n=8.

Tukey testi sonuçları, tedavi edilmeyen diyabetik hayvanların hareketsiz kalma sürelerinin normoglisemik kontrol hayvanlarına göre anlamlı ölçüde uzun olduğunu ortaya koymuştur. Diğer yandan, 8 ve 16 mg/kg reboksetin tedavisi uygulanan diyabetik sıçanların hareketsiz kalma süreleri reboksetin uygulanmayan diyabetik hayvanlara göre kayda değer ölçüde kısalmıştır (Şekil 5).

Serum fizyolojik verilen normoglisemik (kontrol) ve serum fizyolojik, 8 ve 16 mg/kg reboksetin verilen diyabetik sıçanların modifiye zorlu yüzme testinde kaydedilen tırmanma süreleri Şekil 6'da gösterilmiştir [F(3,28)=10.25, p<0.001].



**Şekil 6.** Normoglisemik (Kontrol), diyabetik (DM), 8 mg/kg (DM+RBX-8) ve 16 mg/kg reboksetin uygulanan diyabetik (DM+RBX-16) sıçanların modifiye zorlu yüzme testinde ölçülen tırmanma süreleri. \*\*\* $p < 0.001$ : Kontrol grubuna göre farklılık; <sup>b</sup> $p < 0.01$ , <sup>c</sup> $p < 0.001$ : Diyabet grubuna göre farklılık. Tek yönlü ANOVA, post hoc Tukey HSD,  $n=8$ .

Tukey testi sonuçları, tedavi edilmeyen diyabetik hayvanların tırmanma sürelerinin kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde kısa olduğunu göstermiştir. Diğer yandan, 8 ve 16 mg/kg reboksetin tedavisi uygulanan diyabetik sıçanların tırmanma süreleri reboksetin uygulanmayan diyabetik hayvanlara göre kayda değer ölçüde uzamıştır (Şekil 6).

Şekil 7’de serum fizyolojik verilen normoglisemik (kontrol) ve serum fizyolojik, 8 ve 16 mg/kg reboksetin uygulanan diyabetik sıçanların modifiye zorlu yüzme testinde ölçülen yüzme süreleri görülmektedir [ $F(3,28)=7.003$ ,  $p < 0.01$ ]. Tukey testi sonuçları, tedavi edilmeyen diyabetik hayvanların yüzme sürelerinin kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde kısa olduğunu göstermiştir. Diğer yandan, 8 ve 16 mg/kg reboksetin tedavisi uygulanan diyabetik sıçanların yüzme sürelerinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir (Şekil 7).

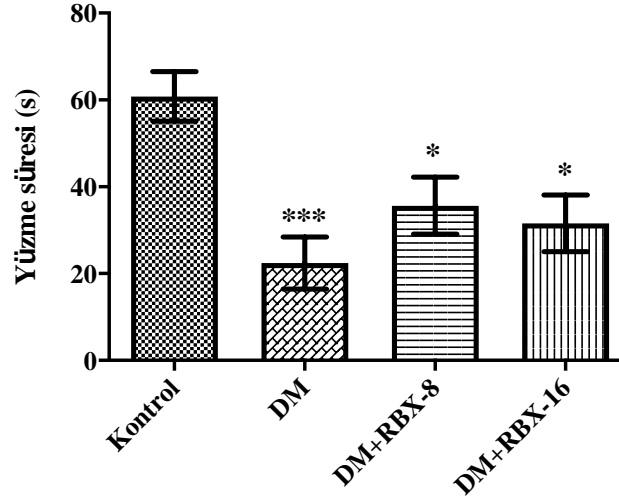
Modifiye zorlu yüzme testi, Porsolt’un geleneksel zorlu yüzme testinde bazı modifikasyonlar yapılarak dizayn edilmiş olan ve kemirgenlerin öğrenilmiş çaresizlik davranışlarını değerlendirmekte sıklıkla kullanılan bir testtir. Test, kemirgenlerin kaçmalarının mümkün olmadığı dar bir silindirde yüzme zorlanmaları esasına dayanır. Söz konusu silindire koyulan hayvan ilk olarak kurtulmak için çabalamakta ancak bir süre sonra çaresizliğe kapılıp hareketsiz (immobil) duruma geçmektedir. Deney hayvanlarının bu hareketsiz duruşu, depresyondaki anhedoni semptomlarını simüle etmektedir [33, 41].

Bu çalışmada modifiye zorlu yüzme testlerinde herhangi bir tedavi almayan diyabetik hayvanların hareketsiz kalma sürelerinin artmış ve aktif davranışlarının (tırmanma ve yüzme) sürelerinin kısalmış olması (Şekil 5-7), bu hayvanların depresyon-benzeri davranış gösterdiklerine işaret etmektedir. Bu çalışmada elde edilen bulgular diyabetik hayvanların depresyon-benzeri davranış gösterdiklerini bildiren önceki raporları desteklemektedir [6,12,13,42,43].

Diyabetik kemirgenler ile yapılan bazı çalışmalar bu hayvanların artmış depresyon-benzeri davranışlarını santral monoamin miktarlarında ve monoaminerjik fonksiyonlarda görülen değişimler ile ilişkilendirmiştir [6,44]. Çalışmalar sonucunda, SSS’de, diyabete bağlı olarak serotoninin, noradrenalinin ve dopaminin sentezlerinin azaldığı, turnover’ının yavaşladığı ve monoaminerjik işlevlerin zayıfladığı bildirilmiştir [6,38,44,45]. Monoaminerjik nörotransmisyonundaki söz konusu değişikliklerin, santral histaminerjik sistemi de etkilediği ileri sürülmüş ve diyabetik hayvanlarda görülen depresyon-benzeri davranışa histaminin  $H_1$  reseptörlerinin aktivasyonunun da katkıda bulunduğu gösterilmiştir [46]. GABAerjik sistemin ve benzodiazepin reseptörlerinin disfonksiyonu da sıçanlarda diyabete bağlı olarak ortaya çıkan depresyon-benzeri davranışlar ile ilişkilendirilmiştir [6,13, 47].

Bu çalışmada diyabetik sıçanlarda depresyon benzeri davranışların ortaya koyulmasından sonra, reboksetin tedavisinin bu durum üzerine etkinliği araştırılmıştır. Reboksetin uygulandığı dozların her ikisinde de diyabetik sıçanların uzamış olan immobilité sürelerini kısaltarak, diyabetik hayvanlar

üzerinde antidepresan etkinliğini göstermiştir (Şekil 5). Diğer yandan bu ilaç, diyabetik sıçanların yüzme sürelerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmaksızın, azalan tırmanma sürelerini artırmıştır (Şekil 6 ve 7). Reboksetin'in diyabetik sıçanlardaki antidepresan etkinliğine katekolaminerjik sistemin aracılık ettiğine işaret eden [33] bu bulgular, selektif noradrenalin geri alım inhibitörü bir ilaç olan reboksetin'in antidepresan-benzeri etki mekanizması ile de uyumludur.



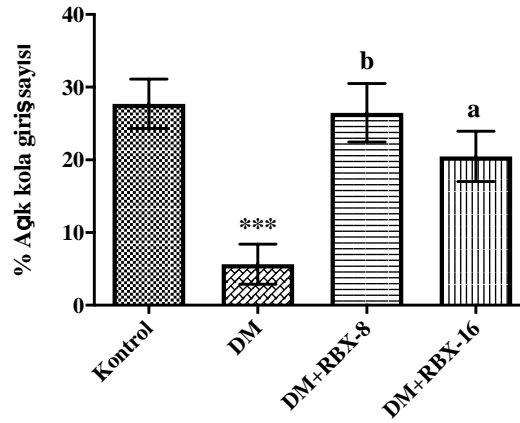
**Şekil 7.** Normoglisemik (Kontrol), diyabetik (DM), 8 mg/kg reboksetin uygulanan diyabetik (DM+RBX-8) ve 16 mg/kg reboksetin uygulanan diyabetik (DM+RBX-16) sıçanların modifiye zorlu yüzme testinde ölçülen yüzme süreleri. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ : Kontrol grubuna göre farklılık. Tek yönlü ANOVA, post hoc Tukey HSD,  $n=8$ .

### Yükseltilmiş Artı Şekilli Labirent Testine İlişkin Bulgular

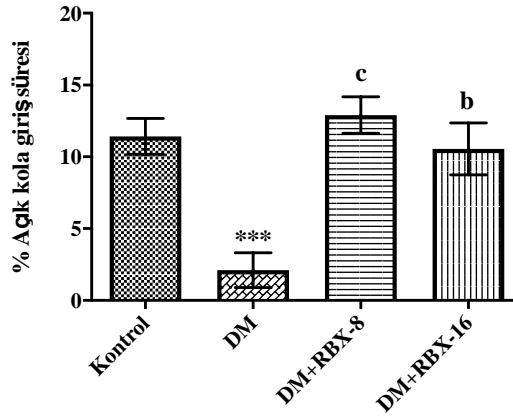
Serum fizyolojik verilen normoglisemik (kontrol) ve serum fizyolojik, 8 ve 16 mg/kg reboksetin uygulanan diyabetik sıçanların yükseltilmiş artı şekilli labirent testindeki % açık kola giriş sayıları Şekil 8'de gösterilmiştir [ $F(3,28)=8.635$ ,  $p < 0.001$ ]. Tukey testi sonuçları, tedavi edilmeyen diyabetik hayvanların % açık kola giriş sayılarının normoglisemik sıçanlara göre düşük olduğunu ortaya koymuştur. Diğer yandan, 8 ve 16 mg/kg reboksetin tedavisi uygulanan diyabetik sıçanların % açık kola giriş sayıları, reboksetin uygulanmayan diyabetik sıçanlara göre kayda değer ölçüde yükselmiştir (Şekil 8).

Serum fizyolojik verilen normoglisemik (kontrol) ve serum fizyolojik, 8 ve 16 mg/kg reboksetin uygulanan diyabetik sıçanların yükseltilmiş artı şekilli labirent testindeki % açık kola giriş süreleri Şekil 9'da gösterilmiştir [ $F(3,28)=11.91$ ,  $p < 0.001$ ]. Tukey testi sonuçları, tedavi edilmeyen diyabetik hayvanların % açık kola giriş sürelerinin normoglisemik sıçanlara göre düşük olduğunu ortaya koymuştur. Diğer yandan, 8 ve 16 mg/kg reboksetin tedavisi uygulanan diyabetik sıçanların % açık kola giriş süreleri, reboksetin uygulanmayan diyabetik sıçanlara göre kayda değer ölçüde yükselmiştir (Şekil 9).

Yükseltilmiş artı şekilli labirent testlerinde kemirgenlerin açık kolda kaldıkları sürenin ve açık kola giriş sayılarının azalması, hayvanların anksiyete düzeylerinin yüksekliğine işaret eder [48,49]. Bu çalışmada diyabetik hayvanların % açık kola giriş sayılarının (Şekil 8) ve % açık kola giriş sürelerinin (Şekil 9) anlamlı şekilde azalmış olması, diyabetin, hayvanların anksiyete düzeylerini yükselttiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular diyabetik hayvanlarda anksiyete düzeylerinin yüksek olduğunu bildiren önceki raporlar ile örtüşmektedir [42,43].



**Şekil 8.** Normoglisemik (Kontrol), diyabetik (DM), 8 mg/kg (DM+RBX-8) ve 16 mg/kg reboksetin uygulanan diyabetik (DM+RBX-16) sıçanların yükseltilmiş artı şekilli labirent testindeki % açık kola giriş sayıları. \*\*\* $p < 0.001$ : Kontrol grubuna göre farklılık; <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>b</sup> $p < 0.01$ : Diyabet grubuna göre farklılık. Tek yönlü ANOVA, post hoc Tukey HSD,  $n=8$ .



**Şekil 9.** Normoglisemik (Kontrol), diyabetik (DM), 8 mg/kg (DM+RBX-8) ve 16 mg/kg reboksetin uygulanan diyabetik (DM+RBX-16) sıçanların yükseltilmiş artı şekilli labirent testindeki % açık kola giriş süreleri. \*\*\* $p < 0.001$ : Kontrol grubuna göre farklılık; <sup>b</sup> $p < 0.01$ , <sup>c</sup> $p < 0.001$ : Diyabet grubuna göre farklılık. Tek yönlü ANOVA, post hoc Tukey HSD,  $n=8$ .

Çeşitli araştırmalar diyabetik hayvanlarda anksiyete düzeylerinin yükselişini GABAerjik [13,50] ve monoaminerjik nörotransmisyonların disfonksiyonu [51,52] ve histaminerjik etkinlikteki değişiklikler [53,46] ile ilişkilendirmiştir. Diğer yandan hipotalamus-hipofiz-adrenal aksın hiperaktivitesi; adrenokortikotropik hormon ve kortikosteroid salınımında artış ve glukokortikoidlerin kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH) üzerindeki negatif feed back mekanizmalarının sensitivitesinin azalması da diyabete bağlı anksiyetenin altında yatan bazı mekanizmalar olarak önerilmiştir [6,54-56].

Bu çalışmada, reboksetin tedavisinin, diyabetik sıçanların azalan % açık kola giriş sayılarını (Şekil 8) ve % açık kola giriş sürelerini (Şekil 9) artırdığı belirlenmiştir. Reboksetin'in diyabetik hayvanların artmış olan anksiyete düzeylerini azalttığını ortaya koyan bu bulgular, doğrudan bu ilacın anksiyolitik etkinliği [57-59] ile ilişkili olabilir. Diğer yandan reboksetinin SSS'de nörotrofik faktörleri destekleyici [60,61] ve nöroinflamasyonu/ nörodejenerasyonu azaltıcı [62] etkilerinin de, bu ilacın diyabet ile indüklenen emosyonel bozukluklara karşı etkinliğine katkıda bulunmuş olması mümkündür.

## Reboksetin Uygulamasının Öğrenme ve Bellek Parametreleri Üzerine Etkileri

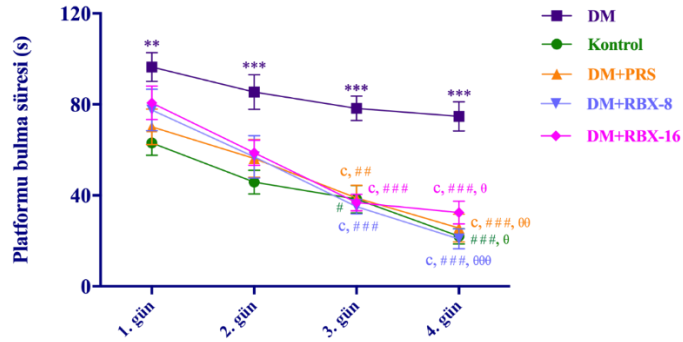
### Morris Su Tankı Testine İlişkin Bulgular



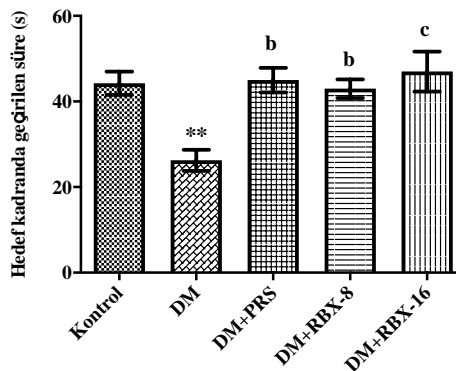
Serum fizyolojik verilen normoglisemik (kontrol) ve serum fizyolojik, 300 mg/kg pirasetam, 8 ve 16 mg/kg reboksetin verilen diyabetik sıçanların Morris su tankı testinde ölçülen platformu bulma süreleri Şekil 10'da gösterilmiştir. Çift yönlü tekrarlı ANOVA sonuçları diyabetik sıçanların platformu bulma süreleri üzerinde tedavi [F(4.35)=22.80,  $p<0.001$ ] ve zaman [F(3.105)=47.01,  $p<0.001$ ] faktörlerinin etkili olduğunu göstermiştir. Diğer yandan bu faktörler arasında anlamlı bir etkileşim bulunmamaktadır [F(12.105)=1.126,  $p>0.05$ ].

Bonferroni testi sonuçları, tedavi edilmeyen diyabetik hayvanların dört gün boyunca kaydedilen platformu bulma sürelerinin, normoglisemik kontrol hayvanlarına göre uzun olduğuna işaret etmiştir. Reboksetin tedavisi verilen diyabetik sıçanların deneyin üçüncü ve dördüncü günlerinde platformu keşfetme sürelerinin tedavi edilmeyen diyabetik hayvanlara göre daha kısa olduğu belirlenmiştir. Referans ilaç pirasetam uygulamaları da deneyin üçüncü ve dördüncü günlerinde diyabetik sıçanların platformu bulma sürelerini tedavi edilmeyen diyabetik sıçanlara göre anlamlı ölçüde azaltmıştır (Şekil 10).

Şekil 11'de serum fizyolojik verilen normoglisemik (kontrol) ve serum fizyolojik, 300 mg/kg pirasetam, 8 ve 16 mg/kg reboksetin verilen diyabetik sıçanların, Morris su tankı testinde hedef kadranda geçirdikleri süreler gösterilmiştir [F(4.35)=7.319,  $p<0.001$ ].



**Şekil 10.** Normoglisemik (Kontrol), diyabetik (DM), 300 mg/kg pirasetam uygulanan diyabetik (DM+PRS), 8 mg/kg (DM+RBX-8) ve 16 mg/kg reboksetin uygulanan diyabetik (DM+RBX-16) sıçanların Morris su tankı testindeki platformu bulma süreleri. \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ : Karşılık gelen kontrol grubuna göre farklılık; <sup>c</sup> $p<0.001$ : Karşılık gelen diyabet grubuna göre farklılık; # $p<0.05$ , ## $p<0.01$ , ### $p<0.001$ : 1. güne göre farklılık; <sup>0</sup> $p<0.05$ , <sup>00</sup> $p<0.01$ , <sup>000</sup> $p<0.001$ : 2. güne göre farklılık. Çift Yönlü Tekrarlı ANOVA, post hoc Bonferroni,  $n=8$ .

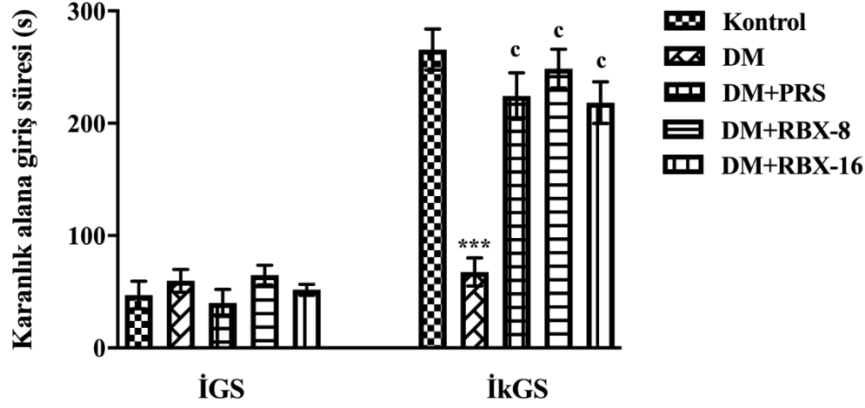


**Şekil 11.** Normoglisemik (Kontrol), diyabetik (DM), 300 mg/kg pirasetam uygulanan diyabetik (DM+PRS), 8 mg/kg (DM+RBX-8) ve 16 mg/kg reboksetin uygulanan diyabetik (DM+RBX-16) sıçanların hedef kadranda geçirdikleri süre. \*\* $p<0.01$ : Kontrol grubuna göre farklılık; <sup>b</sup> $p<0.01$ , <sup>c</sup> $p<0.001$ : Diyabet grubuna göre farklılık. Tek yönlü ANOVA, post hoc Tukey HSD,  $n=8$ .

Tukey testi sonuçları, tedavi edilmeyen diyabetik hayvanların hedef kadranda kalma sürelerinin normoglisemik hayvanlara göre daha kısa olduğunu göstermiştir. Diğer yandan, 8 ve 16 mg/kg reboksetin tedavisi alan ve referans ilaç pirasetam uygulanan diyabetik sıçanların hedef kadranda, tedavi verilmeyen diyabetik sıçanlara göre daha uzun süre geçirdikleri belirlenmiştir (Şekil 11).

### **Pasif Sakınma Testine İlişkin Bulgular**

Serum fizyolojik verilen normoglisemik (kontrol) ve serum fizyolojik, 300 mg/kg pirasetam, 8 ve 16 mg/kg reboksetin verilen diyabetik sıçanların pasif sakınma testinde kaydedilen karanlık alana giriş süreleri Şekil 12’de gösterilmiştir [ $F(4,35)=20.14$ ,  $p<0.001$ ].



**Şekil 12.** Normoglisemik (Kontrol), diyabetik (DM), 300 mg/kg pirasetam uygulanan diyabetik (DM+PRS), 8 mg/kg (DM+RBX-8) ve 16 mg/kg reboksetin uygulanan diyabetik sıçanların (DM+RBX-16) pasif sakınma testindeki karanlık alana giriş süreleri. \*\*\*  $p<0.001$ : Kontrol grubuna göre farklılık; <sup>c</sup> $p<0.001$ : Diyabet grubuna göre farklılık. Tek yönlü ANOVA, post hoc Tukey HSD,  $n=8$ .

Tukey testi sonuçları, pasif sakınma testinin 1. gününde sıçanların edinim denemeleri sırasında ölçülen İGS değerlerinde gruplar arasında bir farklılık olmadığını ortaya koymuştur. Ancak testin 2. gününde tedavi verilmeyen diyabetik hayvanların İkGS değerleri normoglisemik kontrol grubuna göre kısalmıştır. Diğer yandan referans ilaç pirasetam ve 8 ve 16 mg/kg reboksetin uygulamaları diyabetik sıçanların İkGS değerlerini kayda değer ölçüde uzatmıştır (Şekil 12).

Morris su tankı ve pasif sakınma testleri, sırasıyla, deney hayvanlarının uzamsal ve emosyonel öğrenme ve bellek parametrelerini değerlendirmek için sıklıkla kullanılan testlerdir [36]. Bu çalışmada yapılan Morris su tankı testinde diyabetik sıçanların saklı platformu normoglisemik hayvanlara kıyasla daha geç sürede buldukları (Şekil 10); hedef kadranda geçirdikleri sürelerin ise normoglisemik kontrollerden daha kısa olduğu belirlenmiştir (Şekil 11). Bu veriler diyabetin, sıçanların uzamsal öğrenme ve bellek süreçlerinde bozulmaya neden olduğunu ortaya koymuştur.

Pasif sakınma testinde ikinci gün yapılan ölçümlerde ise diyabetik hayvanların karanlık alana giriş sürelerinin normoglisemik kontrol hayvanlarına göre anlamlı derecede kısaldığı görülmüştür (Şekil 12). Diğer bir ifade ile hayvanların emosyonel bellek işlevlerinde aksaklık olmuş ve karanlık alanda karşılaştıkları elektrik şokunu, normoglisemik hayvanlar kadar başarılı şekilde hatırlayamamışlardır. Pasif sakınma testlerinden elde edilen ve diyabetin kognitif işlevleri bozduğuna işaret eden bu bulgular, Morris su tankı testlerinden elde edilen verileri desteklemiştir. Nitekim diyabetik hayvanlarda uzamsal [14,63] ve emosyonel [42,64] öğrenme ve bellek süreçlerinin bozulduğu daha önceki çalışmalar ile de gösterilmiştir.

Diyabetik hayvanlarda ortaya çıkan kognitif işlev bozuklukları hipokampusta GABAerjik ve glutamaterjik nörotransmisyonların disfonksiyonu [47,65]; beynin hipokampus, frontal korteks ve amigdala gibi alanlarında serotonerjik disfonksiyon, dopamin ve noradrenalin seviyelerindeki değişiklikler [44,45], zayıflamış kolinerjik nörotransmisyon [8,66] ve nitrik oksit'in sentez ve

işlevlerinde bozulma [67] ile ilişkilendirilmiştir. Diğer yandan, prefrontal korteks, hipokampus ve oksipital korteks gibi öğrenme alanlarındaki nöronlarda yapısal bozulma [68], sinaptik plastisite bozuklukları, nöronal apoptozis [6,69] ve serebral kan akımındaki azalma [69] diyabete bağlı kognitif işlev bozukluklarından sorumlu tutulan diğer bazı mekanizmalardır.

Bu çalışmada, reboksetin tedavisinin, diyabetik sıçanların uzayan platformu bulma sürelerini kısalttığı (Şekil 10); kısalan hedef kadranda kalma sürelerini ise uzattığı (Şekil 11) gösterilmiştir. Pasif sakınma testinde ise reboksetin, diyabetik sıçanların karanlık alana giriş sürelerinde, tedavi edilmeyen diyabetik sıçanlara göre anlamlı bir uzamaya neden olmuştur (Şekil 12). Morris su tankı ve pasif sakınma testlerinden elde edilen bu veriler reboksetin'in diyabetik hayvanlarda hem uzamsal hem de emosyonel öğrenme ve bellek parametrelerini güçlendirdiğine işaret etmiştir.

Elde edilen bu bulgular reboksetin'in bilişsel performans üzerine etkilerine ilişkin önceki çalışmaların bulguları ile örtüşmektedir. Örneğin bu ilacın, yeni nesne tanıma testleri uygulanan sağlıklı [70,71] ve depresif sıçanlarda [71] tanıma belleğini güçlendirdiği gösterilmiş ve bu etkiye dopaminerjik sistemin aracılık ettiği ileri sürülmüştür. Diğer yandan, reboksetin'in skopolamin ile deneysel amnezi oluşturulmuş hayvanlarda anti-amnezik etki gösterdiği rapor edilmiştir [72]. Neonatal klomipramin uygulaması ile depresyon modeli oluşturulan sıçanlara uygulanan reboksetin tedavisinin, uzamsal öğrenme ve bellek hasarını düzelttiği bildirilmiştir [73]. Ayrıca intermittent yüzme stresi nedeni ile Morris su tankında öğrenme ve hatırlama işlevleri bozulan deney hayvanlarına uygulanan reboksetin tedavisinin de bozulan kognitif performansı iyileştirdiği rapor edilmiştir [22]. Söz konusu prelinik bulguların yanı sıra yapılan klinik çalışmalar da reboksetin'in depresif hastaların bilişsel fonksiyonlarının hızını ve dikkat sürdürme yeteneklerini güçlendirdiğini; duygu-durum bozukluğu olan hastaların yanı sıra bu tip rahatsızlığa sahip olmayan bireylerde de bilişsel fonksiyonlar üzerine olumlu etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur [21,73,74]. Söz konusu literatür bilgileri ışığında, bu antidepresan diyabetik sıçanların kognitif performanslarını artırıcı etkisi, doğrudan sahip olduğu nootropik etkinlik potansiyeli ile ilişkilendirilebilir.

Bununla birlikte reboksetin'in SSS'de diyabet ile indüklenen moleküler düzeydeki bozuklukları restore etmiş olması da mümkün olabilir. Nitekim reboksetin'in de üyesi olduğu antidepresan ilaçların diyabetik deneklerin beyinlerindeki yetersiz LTP indüksiyonunu, azalan sinaptik protein seviyelerini (sinaptofizin, postsinaptik yoğunluk 95 gibi) ve zayıflayan sinaptik gücü [75,76] iyileştirme potansiyeline sahip oldukları bilinmektedir [73,77-79]. Bu düşüncüyü destekler nitelikte olmak üzere; araştırma grubumuz tarafından daha önce yapılan bir çalışmada antidepresan bir ilaç olan agomelatin'in (40 ve 80 mg/kg, 2 hafta) STZ-diyabetik sıçanların öğrenme ve bellek performanslarında kayda değer bir iyileşme sağladığı ve bu hayvanların beyinlerinde hipokampal alt alanlardaki nöron kayıplarını önlediği gösterilmiştir [80]. Yapılan bir başka çalışmada da selektif serotonin geri alım inhibitörü bir ilaç olan fluoksetin'in STZ ile diyabet oluşturulmuş farelerde, uzamsal çalışma belleğindeki bozulmayı ve anksiyete-benzeri davranışları düzelttiği gösterilmiştir [81]. 10 gün süre ile 10 mg/kg dozda uygulanan fluoksetin tedavisinin STZ-diyabetik farelerin dentat gyrus'larında azalan nörogenezi ve nöronal farklılaşmayı arttırdığı; hilar yoğunluk kaybını önleyici etkinlik gösterdiği bildirilmiştir [82]. Bu bağlamda, bu çalışmada reboksetin'in diyabete bağlı olarak gelişen emosyonel ve kognitif değişiklikler üzerindeki etkilerinin, bu ilacın doğrudan antidepresan, anksiyolitik ve nootropik potansiyelinden kaynaklanması mümkünse de; söz konusu farmakolojik etkilere bir antidepresan olarak sağladığı nörotrofik desteğin ve nöroprotektif etkinliğin katkısını da göz ardı etmemek gerekir.

Diğer yandan, bilişsel işlevleri iyileştirmede, noradrenalin transportunu bloke eden antidepresanların, seçici olarak serotonin transportunu bloke eden antidepresanlara kıyasla daha etkili olduğu [21,83] bilgisinden hareketle, farklı antidepresan ilaçların diyabetin santral komplikasyonları üzerine etkinliklerinin de farklı olabileceği düşünülebilir. Bu bağlamda farklı etki mekanizmasına sahip antidepresan ilaçların, diyabet ile indüklenen emosyonel ve kognitif bozukluklar üzerine etkilerinin karşılaştırıldığı kapsamlı prelinik ve klinik çalışmaların, diyabete bağlı söz konusu komplikasyonların tedavisinde kullanılacak ilk seçim ilaçların belirlenmesi açısından yararlı olacağı açıktır.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgular birlikte değerlendirildiğinde, reboksetin tedavisinin diyabetik sıçanların artmış depresyon ve anksiyete düzeylerini azalttığı ve zayıflamış bilişsel performanslarını güçlendirdiği belirlenmiştir. Araştırma grubumuz tarafından yürütülen daha önceki çalışmalarda, reboksetin'in 8 ve 16 mg/kg dozlarında diyabete bağlı nöropatik ağrının tedavisinde de

kayda değer bir potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir [24]. Bu bilgilerin ve bu araştırmada elde edilen verilerin ışığında reboksetin'in diyabete eşlik eden çeşitli komplikasyonların tedavisinde çoklu yarar sağlayabilecek bir ajan olabileceği ileri sürülebilir.

Reboksetin'in diyabetik popülasyonda kullanım potansiyeline ilişkin diğer bir avantaj ise, bu ilacın sıçanlarda diyabetik komplikasyonlara karşı etkin olduğu gösterilmiş olan dozlarında, plazma glukoz seviyeleri üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamasıdır (Şekil 1). Bu bulgu daha önceki literatür bilgileri ile de örtüşmektedir [23,24]. Bu durum reboksetin'in diyabetik hastalarda glisemik kontrolü bozucu bir yan etkiyi indüklemeye potansiyeli taşımadığına işaret ettiği için önemlidir.

Özet olarak bu çalışmada reboksetin'in diyabetik hastalarda insidansı yüksek olan davranışsal ve bilişsel bozuklukların tedavisi için kayda değer bir potansiyele sahip olduğu ilk kez ortaya koyulmuştur. Elde edilen bu prelinik bulgular doğrultusunda, bu ilacın diyabetik komplikasyonların tedavisindeki potansiyelini ortaya koyacak klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## TEŞEKKÜR

Bu araştırma, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: 1809S307).

## YAZAR KATKILARI

Kavram: N.T.Y., Ü.D.Ö., Ö.D.C.; Tasarım: N.T.Y., Ü.D.Ö.; Denetim: Ö.D.C., U.İ.Ü.; Kaynaklar: Ü.D.Ö.; Malzemeler: Ü.K.; Veri Toplama ve/veya İşleme: N.T.Y., U.İ.Ü., Ü.K.; Analiz ve/veya Yorumlama: Ö.D.C., Ü.D.Ö.; Literatür Taraması: N.T.Y., U.İ.Ü., Ü.K.; Makalenin Yazılması: N.T.Y., Ö.D.C., Ü.D.Ö.; Kritik İnceleme: N.T.Y., Ö.D.C., U.İ.Ü., Ü.D.Ö., Ü.K.; Diğer: -

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

## ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışmanın deneysel protokolü Anadolu Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Karar tarihi: 9/11/2018; Karar No: 2018/51).

## KAYNAKLAR

1. American Diabetes Association (2012). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 35(1), 64-87. [\[CrossRef\]](#)
2. Wolfsdorf, J., Glaser, N., Sperling, M.A. (2006). Diabetic ketoacidosis in infants, children, and adolescents: A consensus statement from the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 29(5), 1150-1159. [\[CrossRef\]](#)
3. Venkatraman, R., Singhi, S.C. (2006). Hyperglycemic hyperosmolar nonketotic syndrome. *Indian Journal of Pediatrics*, 73(1), 55-60. [\[CrossRef\]](#)
4. Tripathi, B.K., Srivastava, A.K. (2006). Diabetes mellitus: Complications and therapeutics. *International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 12(7), 130-147.
5. Forbes, J.M., Cooper, M.E. (2013). Mechanisms of diabetic complications. *Physiological Reviews*, 93(1), 137-188. [\[CrossRef\]](#)
6. Can, O.D., Öztürk, Y. (2009). Diabetes mellitus'un diğer yüzü: Psikiyatrik ve nörodejeneratif komplikasyonlar. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 29(4), 968-975.
7. Kovacs, M., Goldston, D., Obrosky, D.S., Bonar, L.K. (1997). Psychiatric disorders in youths with IDDM: Rates and risk factors. *Diabetes Care*, 20(1), 36-44. [\[CrossRef\]](#)
8. Pasquier, F., Boulogne, A., Leys, D., Fontaine, P. (2006). Diabetes mellitus and dementia. *Diabetes & Metabolism*, 32(5), 403-414. [\[CrossRef\]](#)
9. Yager, J.Y. (2002). Hypoglycemic injury to the immature brain. *Clinics in Perinatology*, 29(4), 651-674. [\[CrossRef\]](#)
10. Sima, A.A., Kamiya, H., Li, Z.G. (2004). Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system

- complications in diabetes. *European Journal of Pharmacology*, 490(1), 187-197. [\[CrossRef\]](#)
11. Ahmad, Q., Merali, Z. (1988). The spontaneously diabetic Wistar-BB rat manifests altered grooming and catalepsy responses: Implications of impaired dopamine function. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 12(2), 291-298. [\[CrossRef\]](#)
  12. Hilakivi-Clarke, L.A., Wozniak, K.M., Durcan, M.J., Linnoila, M. (1990). Behavior of streptozotocin-diabetic mice in tests of exploration, locomotion, anxiety, depression and aggression. *Physiology & Behavior*, 48(3), 429-433. [\[CrossRef\]](#)
  13. Miyata, S., Hirano, S., Kamei, J. (2005). Abnormal benzodiazepine receptor function in the depressive-like behavior of diabetic mice. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 82(4), 615-620. [\[CrossRef\]](#)
  14. Kamal, A., Biessels, G.J., Duis, S.E., Gispen, W.H. (2000). Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: Interaction of diabetes and ageing. *Diabetologia*, 43(4), 500-506. [\[CrossRef\]](#)
  15. Bannerman, D.M., Good, M.A., Butcher, S.P., Ramsay, M., Morris, R.G. (1995). Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. *Nature*, 378(6553), 182-186. [\[CrossRef\]](#)
  16. McCarthy, A.M., Lindgren, S., Mengeling, M.A., Tsalikian, E., Engvall, J.C. (2002). Effects of diabetes on learning in children. *Pediatrics*, 109(1), E9. [\[CrossRef\]](#)
  17. Ryan, C.M., Geckle, M. (2000). Why is learning and memory dysfunction in Type 2 diabetes limited to older adults? *Diabetes /Metabolism Research and Reviews*, 16(5), 308-315. [\[CrossRef\]](#)
  18. James, T., Kula, B., Choi, S., Khan, S.S., Bekar, L.K., Smith, N.A. (2021). Locus coeruleus in memory formation and Alzheimer's disease. *The European Journal of Neuroscience*, 54(8), 6948-6959. [\[CrossRef\]](#)
  19. van Stegeren, A.H. (2008). The role of the noradrenergic system in emotional memory. *Acta Psychologica*, 127(3), 532-541. [\[CrossRef\]](#)
  20. Hakamata, Y., Mizukami, S., Izawa, S., Okamura, H., Mihara, K., Marusak, H., Moriguchi, Y., Hori, H., Hanakawa, T., Inoue, Y., Tagaya, H. (2022). Implicit and explicit emotional memory recall in anxiety and depression: Role of basolateral amygdala and cortisol-norepinephrine interaction. *Psychoneuroendocrinology*, 136, 105598. [\[CrossRef\]](#)
  21. Ferguson, J.M., Wesnes, K.A., Schwartz, G.E. (2003). Reboxetine versus paroxetine versus placebo: Effects on cognitive functioning in depressed patients. *International Clinical Psychopharmacology*, 18(1), 9-14. [\[CrossRef\]](#)
  22. Warner, T.A., Drugan, R.C. (2012). Morris water maze performance deficit produced by intermittent swim stress is partially mediated by norepinephrine. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 101, 24-34. [\[CrossRef\]](#)
  23. Khanam, R., Pillai, K.K. (2005). Lack of hypo/hyperglycemic effects of reboxetine in diabetic and non-diabetic rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 19(6), 657-659. [\[CrossRef\]](#)
  24. Turan Yücel, N., Can, Ö.D., Demir Özkay, Ü. (2020). Catecholaminergic and opioidergic system mediated effects of reboxetine on diabetic neuropathic pain. *Psychopharmacology*, 237(4), 1131-1145. [\[CrossRef\]](#)
  25. Aydın, S., Ozkul, C., Yucel, N.T., Karaca, H. (2021). Gut microbiome alteration after Reboxetine administration in type-1 diabetic rats. *Microorganisms*, 9(9), 1948. [\[CrossRef\]](#)
  26. Skalska, S., Kyselova, Z., Gajdosikova, A., Karasu, C., Stefek, M., Stolc, S. (2008). Protective effect of stobadine on NCV in streptozotocin-diabetic rats: Augmentation by vitamin E. *General Physiology and Biophysics*, 27(2), 106-114. [\[CrossRef\]](#)
  27. Zaghoul, R.A., Abdelghany, A.M., Samra, Y.A. (2022). Rutin and selenium nanoparticles protected against STZ-induced diabetic nephropathy in rats through downregulating Jak-2/Stat3 pathway and upregulating Nrf-2/HO-1 pathway. *European Journal of Pharmacology*, 175289. [\[CrossRef\]](#)
  28. Ramzani Ghara, A., Ezzati Ghadi, F., Hosseini, S.H., Piacente, S., Cerulli, A., Alizadeh, A., Mirmahmoudi, R. (2021). Antioxidant and antidiabetic effect of capparid edgew (forssk.) extract on liver and pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 8(1), 76-82.
  29. Üçel, U.İ., Can, Ö.D., Demir Özkay, Ü., Öztürk, Y. (2015). Antihyperalgesic and antiallodynic effects of mianserin on diabetic neuropathic pain: A study on mechanism of action. *European Journal of Pharmacology*, 756, 92-106. [\[CrossRef\]](#)
  30. Scheuer, K., Rostock, A., Bartsch, R., Müller, W.E. (1999). Piracetam improves cognitive performance by restoring neurochemical deficits of the aged rat brain. *Pharmacopsychiatry*, 32(1), 10-16. [\[CrossRef\]](#)
  31. Can, O.D., Öztürk, Y., Özkay, U.D. (2011). Effects of insulin and St. John's Wort treatments on anxiety, locomotory activity, depression, and active learning parameters of streptozotocin-diabetic rats. *Planta Medica*, 77(18), 1970-1976. [\[CrossRef\]](#)
  32. Spolidório, P.C., Echeverry, M.B., Iyomasa, M., Guimarães, F.S., Del Bel, E.A. (2007). Anxiolytic effects induced by inhibition of the nitric oxide-cGMP pathway in the rat dorsal hippocampus. *Psychopharmacology*, 195(2), 183-192. [\[CrossRef\]](#)



33. Cryan, J.F., Markou, A., Lucki, I. (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: Recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(5), 238-245. [\[CrossRef\]](#)
34. Zanolini, P., Rivasi, M., Zavatti, M., Brusiani, F., Baraldi, M. (2005). New insight in the neuropharmacological activity of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(1), 102-106. [\[CrossRef\]](#)
35. Can, Ö.D., Ulupinar, E., Özkay, Ü.D., Yegin, B., Öztürk, Y. (2012). The effect of simvastatin treatment on behavioral parameters, cognitive performance, and hippocampal morphology in rats fed a standard or a high-fat diet. *Behavioural Pharmacology*, 23(5-6), 582-592. [\[CrossRef\]](#)
36. Üçel, U.İ., Can, Ö.D., Demir Özkay, Ü., Ulupinar, E. (2020). Antiamnesic effects of tofisopam against scopolamine-induced cognitive impairments in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 190, 172858. [\[CrossRef\]](#)
37. Nagayach, A., Patro, N., Patro, I. (2014). Experimentally induced diabetes causes glial activation, glutamate toxicity and cellular damage leading to changes in motor function. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 355. [\[CrossRef\]](#)
38. Trulsson, M.E., Himmel, C.D. (1983). Decreased brain dopamine synthesis rate and increased [<sup>3</sup>H] spiroperidol binding in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Neurochemistry*, 40(5), 1456-1459. [\[CrossRef\]](#)
39. Shimizu, H., Shimomura, Y., Takahashi, M., Kobayashi, I., Kobayashi, S. (1990). Dopamine receptor in the streptozotocin-induced diabetic rats. *Experimental and Clinical Endocrinology*, 95(2), 263-266. [\[CrossRef\]](#)
40. Abbruzzese, G., Schenone, A., Scramuzza, G., Caponnetto, C., Gasparetto, B., Adezati, L., Abbruzzese, M., Viviani, G.L. (1993). Impairment of central motor conduction in diabetic patients. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 89(5), 335-340. [\[CrossRef\]](#)
41. Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M. (1977). Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266, 730-732. [\[CrossRef\]](#)
42. Tabatabaei, S., Ghaderi, S., Bahrami-Tapehebur, M., Farbood, Y., Rashno, M. (2017). Aloe vera gel improves behavioral deficits and oxidative status in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, 279-290. [\[CrossRef\]](#)
43. Rahmani, G., Farajdokht, F., Mohaddes, G., Babri, S., Ebrahimi, V., Ebrahimi, H. (2020). Garlic (*Allium sativum*) improves anxiety- and depressive-related behaviors and brain oxidative stress in diabetic rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 126(2), 95-100. [\[CrossRef\]](#)
44. Bellush, L.L., Reid, S.G., North, D. (1991). The functional significance of biochemical alterations in streptozotocin-induced diabetes. *Physiology & Behavior*, 50(5), 973-981. [\[CrossRef\]](#)
45. Sumiyoshi, T., Ichikawa, J., Meltzer, H.Y. (1997). The effect of streptozotocin-induced diabetes on dopamine<sub>2</sub>, serotonin<sub>1A</sub> and serotonin<sub>2A</sub> receptors in the rat brain. *Neuropsychopharmacology*, 16(3), 183-190. [\[CrossRef\]](#)
46. Hirano, S., Miyata, S., Onodera, K., Kamei, J. (2006). Effects of histamine H<sub>1</sub> receptor antagonists on depressive-like behavior in diabetic mice. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 83(2), 214-220. [\[CrossRef\]](#)
47. Kalueff, A., Nutt, D.J. (1996). Role of GABA in memory and anxiety. *Depression and Anxiety*, 4(3), 100-110. [\[CrossRef\]](#)
48. Adamec, R., Shallow, T. (2000). Effects of baseline anxiety on response to kindling of the right medial amygdala. *Physiology & Behavior*, 70(1-2), 67-80. [\[CrossRef\]](#)
49. Simon, P., Dupuis, R., Costentin, J. (1994). Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behavioural Brain Research*, 61(1), 59-64. [\[CrossRef\]](#)
50. Gomez, R., Vargas, C.R., Wajner, M., Barros, H.M. (2003). Lower in vivo brain extracellular GABA concentration in diabetic rats during forced swimming. *Brain Research*, 968(2), 281-284. [\[CrossRef\]](#)
51. Figlewicz, D.P., Brot, M.D., McCall, A.L., Szot, P. (1996). Diabetes causes differential changes in CNS noradrenergic and dopaminergic neurons in the rat: A molecular study. *Brain Research*, 736(1-2), 54-60. [\[CrossRef\]](#)
52. Gotoh, M., Li, C., Yatoh, M., Okabayashi, N., Habu, S., Hirooka, Y. (2006). Hypothalamic monoamine metabolism is different between the diabetic GK (Goto-Kakizaki) rats and streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain Research*, 1073-1074, 497-501. [\[CrossRef\]](#)
53. Gill, D.S., Thompson, C.S., Dandona, P. (1988). Increased histamine in plasma and tissues in diabetic rats. *Diabetes Research*, 7(1), 31-34. [\[CrossRef\]](#)
54. Chan, O., Inouye, K., Riddell, M.C., Vranic, M., Matthews, S.G. (2003). Diabetes and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Minerva Endocrinologica*, 28(2), 87-102.
55. De Nicola, A.F., Fridman, O., Del Castillo, E.J., Foglia, V.G. (1976). The influence of streptozotocin

- diabetes on adrenal function in male rats. *Hormone and Metabolic Research*, 8(5), 388-392. [\[CrossRef\]](#)
56. Scribner, K.A., Walker, C.D., Cascio, C.S., Dallman, M.F. (1991). Chronic streptozotocin diabetes in rats facilitates the acute stress response without altering pituitary or adrenal responsiveness to secretagogues. *Endocrinology*, 129(1), 99-108. [\[CrossRef\]](#)
57. Lapmanee, S., Charoenphandhu, J., Charoenphandhu, N. (2013). Beneficial effects of fluoxetine, reboxetine, venlafaxine, and voluntary running exercise in stressed male rats with anxiety- and depression-like behaviors. *Behavioural Brain Research*, 250, 316-325. [\[CrossRef\]](#)
58. Stahl, S.M., Mendels, J., Schwartz, G.E. (2002). Effects of reboxetine on anxiety, agitation, and insomnia: Results of a pooled evaluation of randomized clinical trials. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 22(4), 388-392. [\[CrossRef\]](#)
59. Tashakori, A., Arabgol, F., Panaghi, L. (2007). Effect of reboxetine on reduction of anxiety symptoms in depressed children and adolescents. *Jundishapur Scientific Medical Journal*, 6 (2), 210-218.
60. Gao, S., Zhang, X., Xu, H., Miao, D., Qian, J., Wu, Z., Shi, W. (2022). Promoting the hippocampal PPAR $\alpha$  expression participates in the antidepressant mechanism of reboxetine, a selective norepinephrine reuptake inhibitor. *Behavioural Brain Research*, 416, 113535. [\[CrossRef\]](#)
61. Młyniec, K., Nowak, G. (2015). Up-regulation of the GPR39 Zn<sup>2+</sup>-sensing receptor and CREB/BDNF/TrkB pathway after chronic but not acute antidepressant treatment in the frontal cortex of zinc-deficient mice. *Pharmacological Reports*, 67(6), 1135-1140. [\[CrossRef\]](#)
62. Gutiérrez, I.L., González-Prieto, M., Caso, J.R., García-Bueno, B., Leza, J.C., Madrigal, J. (2019). Reboxetine treatment reduces neuroinflammation and neurodegeneration in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease: Role of CCL2. *Molecular Neurobiology*, 56(12), 8628-8642. [\[CrossRef\]](#)
63. Liu, P., Li, H., Wang, Y., Su, X., Li, Y., Yan, M., Ma, L., Che, H. (2020). Harmine ameliorates cognitive impairment by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and enhancing the BDNF/TrkB signaling pathway in STZ-induced diabetic rats. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 535. [\[CrossRef\]](#)
64. Baluchnejadmojarad, T., Kiasalari, Z., Afshin-Majd, S., Ghasemi, Z., Roghani, M. (2017). S-allyl cysteine ameliorates cognitive deficits in streptozotocin-diabetic rats via suppression of oxidative stress, inflammation, and acetylcholinesterase. *European Journal of Pharmacology*, 794, 69-76. [\[CrossRef\]](#)
65. Gardoni, F., Kamal, A., Bellone, C., Biessels, G.J., Ramakers, G.M., Cattabeni, F., Gispen, W.H., Di Luca, M. (2002). Effects of streptozotocin-diabetes on the hippocampal NMDA receptor complex in rats. *Journal of Neurochemistry*, 80(3), 438-447. [\[CrossRef\]](#)
66. Lakhman, S.S., Kaur, G. (1994). Effect of alloxan-induced diabetes on acetylcholinesterase activity from discrete areas of rat brain. *Neurochemistry International*, 24(2), 159-163. [\[CrossRef\]](#)
67. Arrick, D.M., Sharpe, G.M., Sun, H., Mayhan, W.G. (2007). Diabetes-induced cerebrovascular dysfunction: Role of poly(ADP-ribose) polymerase. *Microvascular Research*, 73(1), 1-6. [\[CrossRef\]](#)
68. Martínez-Tellez, R., Gómez-Villalobos, M., Flores, G. (2005). Alteration in dendritic morphology of cortical neurons in rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin. *Brain Research*, 1048(1-2), 108-115. [\[CrossRef\]](#)
69. Manschot, S.M., Biessels, G.J., Cameron, N.E., Cotter, M.A., Kamal, A., Kappelle, L.J., Gispen, W.H. (2003). Angiotensin converting enzyme inhibition partially prevents deficits in water maze performance, hippocampal synaptic plasticity and cerebral blood flow in streptozotocin-diabetic rats. *Brain Research*, 966(2), 274-282. [\[CrossRef\]](#)
70. Feltmann, K., Konradsson-Geuken, Å., De Bundel, D., Lindskog, M., Schilström, B. (2015). Antidepressant drugs specifically inhibiting noradrenaline reuptake enhance recognition memory in rats. *Behavioral Neuroscience*, 129(6), 701-708. [\[CrossRef\]](#)
71. De Bundel, D., Femenía, T., DuPont, C.M., Konradsson-Geuken, Å., Feltmann, K., Schilström, B., Lindskog, M. (2013). Hippocampal and prefrontal dopamine D1/5 receptor involvement in the memory-enhancing effect of reboxetine. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(9), 2041-2051. [\[CrossRef\]](#)
72. Barth, V., Need, A.B., Tzavara, E. T., Giros, B., Overshiner, C., Gleason, S.D., Wade, M., Johansson, A.M., Perry, K., Nomikos, G.G., Witkin, J.M. (2013). In vivo occupancy of dopamine D3 receptors by antagonists produces neurochemical and behavioral effects of potential relevance to attention-deficit-hyperactivity disorder. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 344(2), 501-510. [\[CrossRef\]](#)
73. Harmer, C.J., Hill, S.A., Taylor, M.J., Cowen, P.J., Goodwin, G.M. (2003). Toward a neuropsychological theory of antidepressant drug action: Increase in positive emotional bias after potentiation of norepinephrine activity. *The American Journal of Psychiatry*, 160(5), 990-992. [\[CrossRef\]](#)
74. Harmer, C.J., O'Sullivan, U., Favaron, E., Massey-Chase, R., Ayres, R., Reinecke, A., Goodwin, G.M., Cowen, P.J. (2009). Effect of acute antidepressant administration on negative affective bias in depressed patients. *The American Journal of Psychiatry*, 166(10), 1178-1184. [\[CrossRef\]](#)

75. Lee, J.H., Ji, S.H., Jung, J.Y., Lee, M.Y., Lee, C.K. (2021). High blood glucose levels affect auditory brainstem responses after acoustic overexposure in rats. *Audiology & Neuro-otology*, 26(4), 257-264. [\[CrossRef\]](#)
76. Wang, Y., Yang, Y., Liu, Y., Guo, A., Zhang, Y. (2022). Cognitive impairments in type 1 diabetes mellitus model mice are associated with synaptic protein disorders. *Neuroscience Letters*, 777, 136587. [\[CrossRef\]](#)
77. Parekh, P.K., Johnson, S.B., Liston, C. (2022). Synaptic mechanisms regulating mood state transitions in depression. *Annual Review of Neuroscience*, 45, 581-601. [\[CrossRef\]](#)
78. Lu, C., Wei, Z., Wang, Y., Li, S., Tong, L., Liu, X., Fan, B., Wang, F. (2022). Soy isoflavones alleviate lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior by suppressing neuroinflammation, mediating tryptophan metabolism and promoting synaptic plasticity. *Food & Function*, 13(18), 9513-9522. [\[CrossRef\]](#)
79. Fan, X.X., Sun, W.Y., Li, Y., Tang, Q., Li, L.N., Yu, X., Wang, S.Y., Fan, A.R., Xu, X.Q., Chang, H.S. (2022). Honokiol improves depression-like behaviors in rats by HIF-1 $\alpha$ -VEGF signaling pathway activation. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 968124. [\[CrossRef\]](#)
80. Can, Ö.D., Üçel, U.İ., Demir Özkay, Ü., Ulupınar, E. (2018). The effect of agomelatine treatment on diabetes-induced cognitive impairments in rats: Concomitant alterations in the hippocampal neuron numbers. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2461. [\[CrossRef\]](#)
81. Yuan, P., Zhang, J., Li, L., Song, Z. (2019). Fluoxetine attenuated anxiety-like behaviors in streptozotocin-induced diabetic mice by mitigating the inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2019, 4315038. [\[CrossRef\]](#)
82. Beauquis, J., Roig, P., De Nicola, A.F., Saravia, F. (2009). Neuronal plasticity and antidepressants in the diabetic brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1153, 203-208. [\[CrossRef\]](#)
83. Herrera-Guzmán, I., Gudayol-Ferré, E., Herrera-Guzmán, D., Guàrdia-Olmos, J., Hinojosa-Calvo, E., Herrera-Abarca, J.E. (2009). Effects of selective serotonin reuptake and dual serotonergic-noradrenergic reuptake treatments on memory and mental processing speed in patients with major depressive disorder. *Journal of Psychiatric Research*, 43(9), 855-863. [\[CrossRef\]](#)





## DEVELOPMENT OF BESIFLOXACIN HCL LOADED OCULAR IN SITU GELS; IN VITRO CHARACTERIZATION STUDY

*BESİFLOKSASİN HCL YÜKLÜ OKÜLER İN SITU JELLERİN GELİŞTİRİLMESİ; İN VİTRO  
KARAKTERİZASYON ÇALIŞMASI*

Heybet Kerem POLAT<sup>1\*</sup> , Sedat ÜNAL<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Republic of Turkey Ministry of Health, Turkish Medicines and Medical Devices Agency, 06100  
Ankara, Turkey

<sup>2</sup>Erciyes University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, 38280, Kayseri,  
Turkey

### ABSTRACT

**Objective:** *The aim of this study is to develop in situ gel formulations containing besifloxacin hydrochloride are heat triggered, which are prepared by using different poloxamer and derivatives different polymers that will change the gelling temperature to increase corneal contact time, regulate drug release, improve ocular bioavailability and increase patient compliance increase mucoadhesion.*

**Material and Method:** *Various concentrations of poloxamer 188 (P188) and poloxamer 407 (P407) were used to create the in situ forming gels. To increase the gel's capacity for bioadhesion, mucoadhesives such hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) or hydroxyethyl cellulose (HEC) were included in the formulations. Drug release in vitro, sol-gel transition temperature, rheological behavior, pH, clarity, and mucoadhesion force were all assessed for the produced formulations.*

**Result and Discussion:** *The developed formulations' gelation temperatures ranged from 29 to 35°C. The preparations' viscosity and mucoadhesion force increased with increasing P407, HPMC, and HEC concentrations. Besifloxacin HCl forms in situ gel formulas with K1, K2, K3, and K6 suited for mucoadhesion characteristics, gelation temperature, and viscosity. These formulations exhibit pseudoplastic flow. Increasing polymer concentrations resulted in a reduction in the burst release of the formulations. However, at the end of 6 hours, drug release was finished in all formulations. The results show that in situ gels containing P407 and P188 show promise for besifloxacin HCl application.*

**Keywords:** *Besifloxacin HCl, gel, in situ, ocular, poloxamer*

\* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Heybet Kerem Polat  
**e-mail / e-posta:** kerem\_hybt@hotmail.com, **Phone / Tel.:** +903122183000

**Submitted / Gönderilme :** 03.08.2022

**Accepted / Kabul :** 19.10.2022

**Published / Yayınlanma :** 20.01.2023

## ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, kornea temas süresi artırılmış, ilaç salımı düzenlenmiş, oküler biyoyararlanımı iyileştirilmiş ve hasta uyuncunu artırmak amacıyla jelleşme sıcaklığını değiştirecek farklı poloksomer türevlerinin ve mukoadhezyonu değiştirecek farklı polimerlerin kullanılması ile hazırlanan ısı ile tetiklenip jelleşen ve besifloksasin hidroklorür içeren *in situ* jel formülasyonları geliştirmektir.

**Gereç ve Yöntem:** *In situ* jeller oluşturmak için poloksamer 188 (P188) ve poloksamer 407 (P407)'nin farklı farklı konsantrasyonları denenmiş bununla beraber *in situ* jelin biyo-yapışkanlık özelliklerini artırmak amacıyla formülasyonlara hidroksipropilmetil selüloz (HPMC) veya hidroksietil selüloz (HEC) gibi muko yapışkanlar ilave edilmiştir. Üretilen formülasyonların *in vitro* ilaç salımı, sol-jel geçiş sıcaklığı, reolojik davranışları, pH, berraklık ve mukoadhezif kuvveti değerlendirilmiştir.

**Sonuç ve Tartışma:** Geliştirilen formülasyonların jelleşme sıcaklıkları 29 ila 35°C arasında olduğu belirlenmiştir. Preparatların viskozitesi ve mukoadhezyon kuvveti, artan P407, HPMC ve HEC konsantrasyonları ile artmış. Patlama salımında bir azalma ile sonuçlanmıştır. Bununla beraber 6 saat sonunda bütün formülasyonlarda ilaç salımı bitmiştir. Jelleşme sıcaklığı, viskoziteleri ve mukoadhezyonları uygun olduğu için K1, K2, K3 ve K6 formülasyonları seçilmiş ve bu formülasyonlara besifloksasin HCl yüklenmiştir. Bu dört formülasyonun psödoplastik akış sergilediği tespit edilmiştir. Artan polimer konsantrasyonlarında formülasyonların patlama salımında bir azalma ile sonuçlanmıştır. Bununla beraber 6 saat sonunda bütün formülasyonlarda ilaç salımı bitmiştir. Sonuçlar, besifloksasin HCl uygulaması için P407 ve P188 içeren *in situ* jellerin umut vadettiğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** : Besifloksasin HCl, *in situ*, jel, oküler, poloksamer

## INTRODUCTION

Because of the quick elimination caused by lachrymal flow, blinking, normal tear turnover, and solution drainage by gravity, conventional liquid ophthalmic administration systems have limited bioavailability and short precorneal residence times. To obtain the intended therapeutic effect, repeated solution instillation is therefore required [1].

A common and efficient method for treating bacterial conjunctivitis is topical antibacterial drug application to the conjunctival sac. The most popular antibiotics for treating bacterial conjunctivitis are fluoroquinolones (FQs), although resistance to FQs has emerged as with many other antibiotics. Besifloxacin, the newest fluoroquinolone, the first topical chlorofluoroquinolone, was created to have a stronger antibacterial effect because of its distinct molecular structure, specifically for the treatment of eye illnesses. Besifloxacin has proven its *in vitro* effectiveness against a number of infections, including those that are resistant to other FQs and antibiotic classes. It is applied to both gram positive and gram negative microorganisms. The U.S. Food and Drug Administration (FDA) approved besifloxacin suspension at 0.6% in 2009 for the treatment of bacterial conjunctivitis [2-4]. However, Besifloxacin HCl is a yellow powder with a molecular weight of 430.3 grams. Its melting temperature is 298°C. The PKa value is between 6-7. It has a water solubility of 0.08 mg/ml. As the pH of the medium gets closer to the acid, its solubility increases up to 10 mg/ml.

To extend the residence periods of the implanted dose and improve ocular bioavailability, a variety of ophthalmic vehicles have been created, including inserts, ointments, suspensions, and aqueous gels [5]. However, owing to several limitations, such as obscured vision from ointments or limited patient compliance from inserts, these ocular medication delivery systems have not been widely adopted [6].

To increase patient compliance, extend a drug's precorneal residence duration, and increase ocular bioavailability as a result, several *in situ* gelling systems have been developed. Due to a change in a particular physicochemical parameter (such as pH, temperature, and ions) in the cul-de-sac, these systems display sol-to-gel phase transitions [7].

Known for its great chemical compatibility, low toxicity, high solubility capacity for a variety of medications, and exceptional drug-release qualities, poloxamer is a surface-active block copolymer

composed of polyoxyethylene and polyoxypropylene [8,9]. However, because they may delay drug release and had a sufficient level of inertness for the eye, poloxamers have been widely used as an ocular drug delivery system. In contrast, a major drawback of poloxamer is its lack of mucoadhesive properties. As a result, additional polymers have been used to enhance the mucoadhesive properties of poloxamer-based ocular formulations, including sodium hyaluronate, carbopol, chitosan, hydroxyethyl cellulose (HEC), and hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) [10-12]. Ocular application of a thermosensitive *in situ* gel (prepared with P 407 and HPMC) loaded with ketorolac did not cause any irritation to the eye [13]. In the stability study performed with Doxycycline loaded thermosensitive *in situ* gels (prepared with P 408 and HPMC), it was determined that pH values, gelling temperatures and drug contents did not change at the end of the study [14].

Our study's goal was to create an *in situ* gelling ocular delivery system for 0.6% besifloxacin HCl employing combinations of poloxamer 407 (P407) and poloxamer 188 (P188). The gel bioadhesion characteristics of two mucoadhesives (HPMC or HEC) were optimized by adding poloxamer at various doses as an adjunct. The produced formulations were assessed for their pH, rheological behavior, sol-gel transition temperature, *in vitro* drug release, and clarity.

## MATERIAL AND METHOD

### Materials

Besifloxacin HCL (Molecular weight: 430.3g), poloxamer 407 (P407), poloxamer 188 (P188), hydroxypropyl methylcellulose (100 cp) (HPMC), hydroxyethyl cellulose (HEC) (640Cp), Benzalkonium chloride (BAK), sodium chloride and phosphate buffered saline (PBS) tablet were purchased from Sigma, Steinheim, Germany.

### Preparation of the *In Situ* Forming Gels

For the creation of besifloxacin HCl *in situ* forming gels, various concentrations of P407 and P188 with mucoadhesives like HPMC and HEC were utilized. Weight-based preparation of medicated *in situ* forming gels was done utilizing the modified cold method [15]. Table 1 lists the ingredients in the prepared formulations.

In a nutshell, for formulations, P407 and P188 were progressively added to the predicted volume of cold acetate buffer (pH 4) (to increase the solubility of besifloxacin HCl) in a vial with a magnetic bar while being continuously mixed with a magnetic stirrer. (Labinco, model BV, The Netherlands). In order to create clear, homogeneous solutions, the partially dissolved poloxamer solutions were kept in the refrigerator and stirred occasionally. Additional quantities of the mucoadhesive polymers HPMC and HEC, each at concentrations of 0.5-1 percent (wt/wt), were mixed with the total poloxamer content during production. In all formulations, NaCl was used as an isotonicity agent and benzalkonium chloride as a preservative (Table 1).

### pH

A pH meter was used to measure the pH. (HANNA, Germany). The measurements were made three times (n=3).

### Clarity

After gelation, the *in situ* gel formulation's clarity was assessed by scrutinizing it in bright light against a dark background [16].

### Gelation Temperature

The gelation temperature was measured according to the method reported by Qi et al. [17]. Briefly, each sample solution weighed 10 g, and it was put in a glass vial with a magnetic bar. The preparation was heated beginning at 20°C, increasing the temperature by 1°C/min, while stirring continuously at 100 rpm (Thermomac-TM19). It was decided to use the gelation temperature as the point at which the magnetic bar stopped moving. Three measurements were made for each.

**Table 1.** Ingredients in *in situ* gels

Code	Content of ingredients in each formulation (% , w/w)						
	Poloxamer 407	Poloxamer 188	HPMC (LV)	HEC (HV)	BAK	NaCl	Acetate Buffer (qs)
<b>K1</b>	15	10	0	0	0,001	0,2	100
<b>K2</b>	15	10	0,5	0	0,001	0,2	100
<b>K3</b>	15	10	0	0,5	0,001	0,2	100
<b>K4</b>	15	10	1	0	0,001	0,2	100
<b>K5</b>	15	10	0	1	0,001	0,2	100
<b>K6</b>	16	10	0	0	0,001	0,2	100
<b>K7</b>	16	10	0,5	0	0,001	0,2	100
<b>K8</b>	16	10	0	0,5	0,001	0,2	100
<b>K9</b>	16	10	1	0	0,001	0,2	100
<b>K10</b>	16	10	0	1	0,001	0,2	100

### Viscosity

With a CP 52 spindle, the Brookfield, DV2T-RV Viscometer (Essex, UK) was used to measure the viscosity of *in situ* gels. The spindle runs at 1, 2.5, 5, 10, 20, 50 rpm angular velocity. *In situ* gel viscosities were assessed at their gelation temperature. At various angular velocities, viscosities were measured, and flow curves were created. Additionally, viscosity at 10 rpm was displayed for comparison. Three measurements were made for each.

### Determination of The Mucoadhesive Force

Using sheep cornea tissue that was obtained locally from butchers, *in vitro* bioadhesive force was assessed using a texture analyzer instrument (TA.XT Plus, StableMicro Systems, UK) [3]. The eye was then situated on the lower arm of the texture analyzer after the *in situ* gel had been applied to one of the device's arms. For a contact period of 60 seconds, the probe from which the membrane was applied to the basis was reduced at a force of 0.2 N and a speed of 0.1 mm/s. Resistance to probe removal was tested to assess the *in situ* gel's bioadhesive efficacy. All bioadhesion measurements were performed in triplicate

### Production of Besifloxacin HCl Contained *In Situ* Gel Formulation

All formulations were assessed for their physical characteristics, and an appropriate formulation was found. To a properly selected *in situ* gel formulation, besifloxacin HCl was added. These four formulations were named K1, K2, K3 and K6. Commercial formulations of besifloxacin HCl are available as 0.6% (w/v) ocular suspensions; consequently, besifloxacin HCl was employed *in situ* gel formulations at a drug concentration of 0.6 %. Table 2 lists the recorded formulations, together with Besifloxacin HCl and their physical characteristics.

### Drug Content

Besifloxacin HCl concentrations were evaluated using a UV-vis spectrophotometer (UVmini-1240 Shimadzu Japan) at 289 nm after diluting 1 ml of *in situ* gel in 2 ml of water, followed by 1 hour of sonication in a bath sonicator [18].

$$\text{Drug Loading (\%)} = \frac{\text{Amount to encapsulated MHL}}{\text{Total weighted}} \times 100$$

**Table 2.** Physical characteristics of medication formulations and their constituents

Formulation components and Physical Properties	K1	K2	K3	K6
Besifloxacin HCl (% w/v)	0.6	0.6	0.6	0.6
Poloxamer 407	15	15	15	16
Poloxamer 188	10	10	10	10
HPMC	0	0,5	0	0
HEC	0	0	0,5	0
BAK	0.001	0.001	0.001	0.001
Sodium chloride	0.2	0.2	0.2	0.2
Acetate Buffer	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
pH ( $\pm$ SD)	4.02 $\pm$ 0.01	4.05 $\pm$ 0.02	4.01 $\pm$ 0.03	4.03 $\pm$ 0.02
Gelation temperature ( $^{\circ}$ C $\pm$ SD)	35 $\pm$ 0.4	34 $\pm$ 0.3	34 $\pm$ 0.4	33 $\pm$ 0.5
Viscosity (centipoise) 25 $^{\circ}$ C	305 $\pm$ 15	314 $\pm$ 35	309 $\pm$ 47	322 $\pm$ 45
Viscosity (centipoise) 35 $^{\circ}$ C	7642 $\pm$ 124	8878 $\pm$ 163	8745 $\pm$ 212	10742 $\pm$ 222
Clarity	Clear	Clear	Clear	Clear

### *In Vitro* Release Studies

*In situ* gel formulations were tested for *in vitro* release using the dialysis bag method [19]. The dialysis membranes (Sigma, D9277) were closed, loaded with 100  $\mu$ l of besifloxacin HCl, and then deposited at 37 $^{\circ}$ C in 10 ml of an isotonic phosphate buffer at pH 7.4. In this way, the sink condition is provided. All of the medium were collected at various intervals (15, 30, 60, 120, 180, 240, and 360 minutes), and 10 ml new buffer media were transferred to replace the withdrawn samples. Besifloxacin HCl concentrations were determined by UV-vis spectrophotometer. The total amount of medicine released from each formulation over time was used to create a release profile for the besifloxacin HCl. Three duplicates of the experiment were carried out.

## RESULT AND DISCUSSION

### Characterization of *In Situ* Gel Formulations

The *in situ* gel formulations were made using a variety of P407 and P188 combinations with or without HPMC or HEC. Poloxamer-containing *in situ* gel compositions were transparent, clear, and colorless by visual inspection. Since non-transparent formulations may cause visual blur and are unpopular with patients, clarity is a highly desired property in ophthalmic formulations [20]. Examining the *in situ* gel formulations in this investigation, it was found that they were all clear (Table 3).

Using a pre-calibrated pH meter, the pH of *in situ* gel compositions was determined. All the formulations were found to have acidic pH, ranging between 4.00 $\pm$ 0.03 to 4.07 $\pm$ 0.01 (Table 1). To avoid causing any irritation at the application site and to stop the medicine from being washed away by the tears produced by the blink mechanism, the pH value of the ocular formulations should be the same as or close to the pH value of the eye. To maintain the stability of the active substance or improve its solubility, formulations with various pH levels can be created. Their solubility influences the bioavailability of medications, thus the items being prepared must dissolve more quickly and are made at a pH that won't irritate the eyes. However, because the preparations must be easily diluted with tears, the buffer strength utilized during preparation must be minimal. Examining the literature reveals that the pH range of 4 to 8 is suitable for eyes [21,22].

It has been determined that ophthalmic thermoreversible gels' sol-gel transition temperatures fall within the 25–34 $^{\circ}$ C range, making them appropriate for ocular administration. If a thermosensitive formulation's gelation temperature is less than 25 $^{\circ}$ C, a gel may develop at room temperature, and if it is

greater than 34°C, a liquid dosage form remains at corneal surface temperature, causing the formulation to drain from the eyes. Depending on the grade, concentration, and other formulation elements used, poloxamer solutions are reported to undergo thermoreversible gelation. Combining the two poloxamer grades would enable the gelation temperature to be modulated to fall within the acceptable range (25-34°C) [23].

**Table 3.** Results of *in situ* gels' *in vitro* characterization analysis

Formulation	pH ( $\pm$ SD)	Gelation temperature ( $^{\circ}$ C $\pm$ SD)	Viscosity (centipoise) 25°C	Viscosity (centipoise) 35°C	Clarity
<b>K1</b>	4.02 $\pm$ 0.01	35 $\pm$ 0.4	305 $\pm$ 15	7642 $\pm$ 124	Clear
<b>K2</b>	4.05 $\pm$ 0.02	34 $\pm$ 0.3	314 $\pm$ 35	8878 $\pm$ 163	Clear
<b>K3</b>	4.01 $\pm$ 0.03	34 $\pm$ 0.4	309 $\pm$ 47	8745 $\pm$ 212	Clear
<b>K4</b>	4.04 $\pm$ 0.02	32 $\pm$ 0.2	335 $\pm$ 29	10252 $\pm$ 128	Clear
<b>K5</b>	4.07 $\pm$ 0.01	31 $\pm$ 0.8	334 $\pm$ 36	10548 $\pm$ 132	Clear
<b>K6</b>	4.03 $\pm$ 0.02	33 $\pm$ 0.5	322 $\pm$ 45	10742 $\pm$ 222	Clear
<b>K7</b>	4.05 $\pm$ 0.06	32 $\pm$ 0.4	325 $\pm$ 31	11642 $\pm$ 432	Clear
<b>K8</b>	4.00 $\pm$ 0.03	32 $\pm$ 0.1	327 $\pm$ 65	12742 $\pm$ 467	Clear
<b>K9</b>	4.02 $\pm$ 0.04	29 $\pm$ 0.2	364 $\pm$ 103	14813 $\pm$ 424	Clear
<b>K10</b>	4.04 $\pm$ 0.02	29 $\pm$ 0.3	368 $\pm$ 94	14942 $\pm$ 214	Clear

To choose formulations with an appropriate sol-gel transition temperature and the lowest overall poloxamer concentrations, two combinations of polymers grades were investigated and used in the creation of the *in situ* forming gels. Results from formulations of besifloxacin HCl *in situ* forming gel consisting of P407/P188 (15/10 and 16/10 %, wt/wt) were excellent. All of the besifloxacin HCl *in situ* forming gel formulations were found to gel between 29 and 35°C, especially K1, K2, K3 and K6, which are thought to be acceptable for ocular administration. This is shown by the data in Table 3.

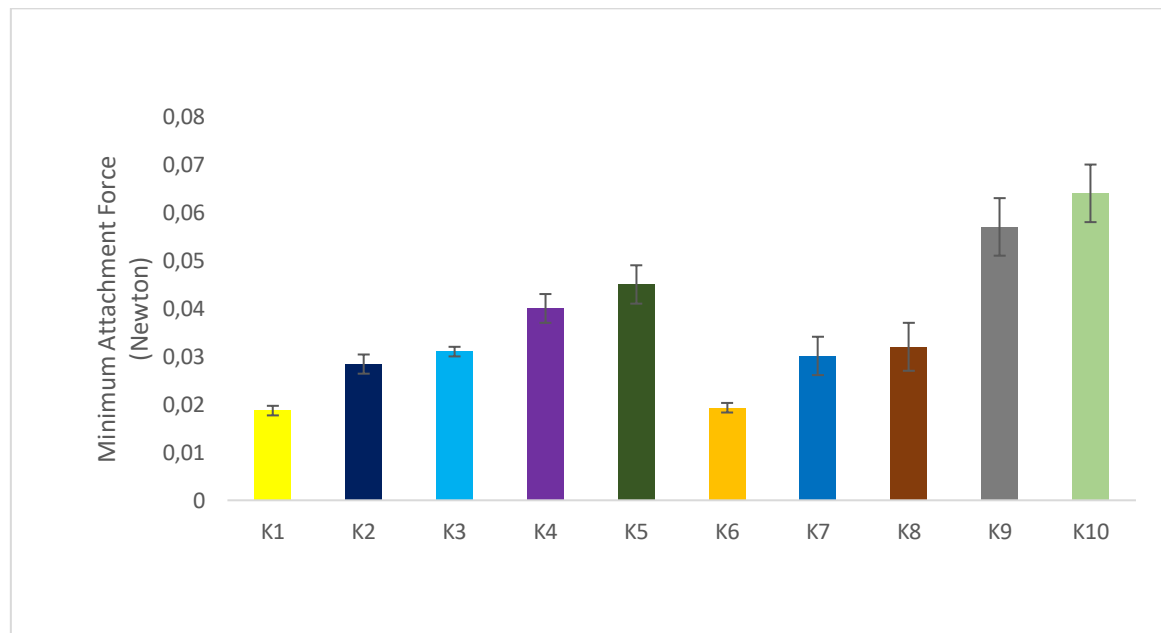
The inclusion of mucoadhesive polymers, which allow attachment of the formulations to the corneal mucin, would significantly minimize drainage of ophthalmic formulations from the precorneal surface. According to Table 3, the *in situ* forming gels' transition temperature gradually decreased as the concentration of the mucoadhesive polymers increased from 0.5 to 1%. The mucoadhesive polymers HPMC and HEC, which decreased the gelation temperature of the gels, were responsible for this. Such mucoadhesive polymers' capacity to bind to polyoxyethylene chains found in the poloxamer molecules may account for their ability to lower the gelation temperature. This will encourage dehydration, resulting in increased intermolecular hydrogen bonding and entanglement of nearby molecules, which will significantly boost gelation at lower temperatures [24].

#### Determination of the Mucoadhesive Force

For *in situ* forming of ophthalmic gels, the mucoadhesive force is a crucial physicochemical factor because it delays the formulation's precorneal residence time by preventing fast drainage. Fig 1 shows the findings from the analysis of the mucoadhesive forces of all the developed formulae.

In formulations comprising mucoadhesive polymers as HPMC and HEC, the prepared besifloxacin HCl *in situ* forming gels' mucoadhesive force dramatically increased. The mucoadhesive polymer concentration in the formulations was also increased, which significantly increased the mucoadhesive force. This could be explained by the fact that the primary source of mucoadhesion is secondary bond forming groups, such as carboxyl, hydroxyl, ether, oxygen, and amine, and that the cellulosic polymers used to make the *in situ* forming gels have a lot of hydroxyl and ether groups along their length, which are in charge of the mucoadhesive properties. The bonds-forming groups in the *in situ* forming gels rose as the concentration of cellulosic derivatives increased, improving the formulations' ability to adhere to mucous membranes.

The mucoadhesive forces of formulations made with HEC are larger than those of formulations having the same proportion of HPMC, according to a closer examination of the mucoadhesive forces in Fig. 1. This might be explained by the use of HEC rather than HPMC, which has a higher viscosity and molecular weight. To enhance adhesion through entanglements and van der Waals forces, high molecular weight is crucial [25].



**Figure 1.** Mucoadhesion study results for formulations

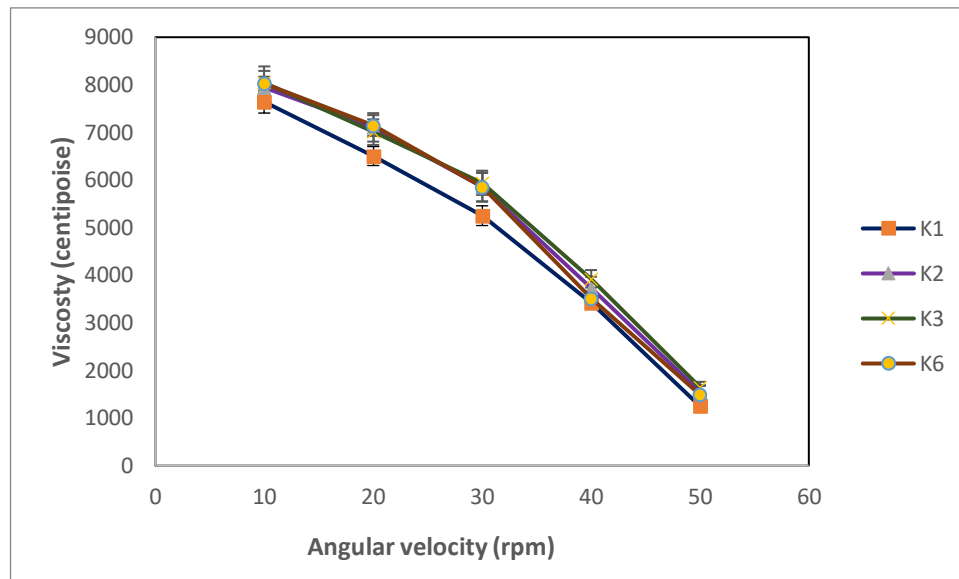
### Viscosity

The effects and usefulness of *in situ* gels *in vivo* are improved by rheological characteristics. When using extremely viscous *in situ* gels, a variety of issues could occur, however when using low viscosity *in situ* gels, tears would quickly remove them from the eye's surface. High viscosity ocular formulations are undesirable because they frequently leave a noticeable residue on the side of the eyelid where they are applied. It is possible to lessen the deleterious effects of ocular reflexes, such as blinking, on the formulation by using *in situ* gel formulations with pseudoplastic behavior. Longer corneal contact time and a more comfortable application are made possible by the formulation's pseudoplastic flow [26].

The impact of rotational velocity modifications on the viscosity of a chosen formulation is depicted in Figure 2 All *in situ* gel formulations at respective gelling temperatures showed pseudoplastic flow (shear thinning system) similar to tear fluid when the rheological characteristics were studied.

According to a review of the literature, the ideal viscosity for optimal ocular administration is between 50 and 50,000 cp. The bioavailability will rise with increasing viscosity as the formulation's time spent in the cul de sac region of the eye rises [14]. As a result, viscosity values for all formulations were determined at 10 rpm at both 25°C and 35°C. The evaluation of the results revealed that the viscosity values varied according to the polymer concentrations (Table 3). This example demonstrates the significant impact that polymer concentration has on viscosity. Examining the literature revealed that the findings were consistent [27].

Four formulations were chosen after the characterization research of all *in situ* gel formulations (pH value, gelation temperature, clarity, viscosity, and mucoadhesion). In each of the four formulations, 0.6 percent of besifloxacin HCl was added (Table 2). The formulas in question are K1, K2, K3, and K6. All formulations were found to be transparent, with pH values around 4, and have gelling temperatures between 35 and 33°C.



**Figure 2.** Rheological behaviors of *in situ* gelling systems

### Drug Loading

It has been discovered that all formulations have loading capacities of more than 97 % (Fig 3). This demonstrates that medication loading is unaffected by polymer concentration. Examining the literature reveals that the findings are consistent [5,28].

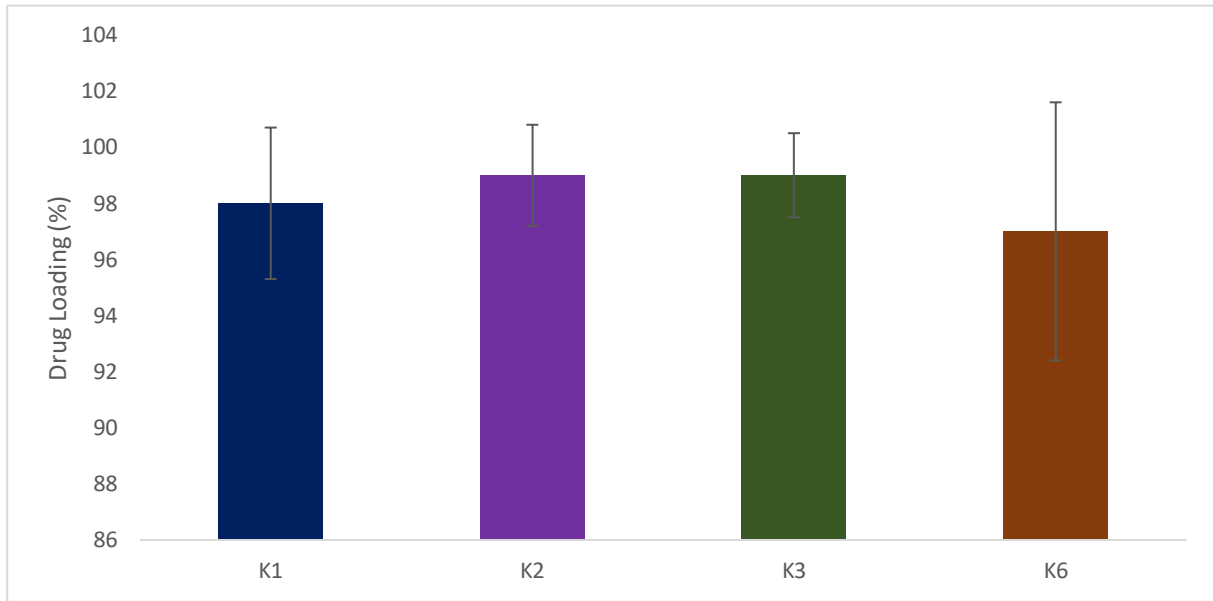
### Drug Release

Formulations containing besifloxacin HCl (percent 0.6) were employed, and *in situ* gels were subjected to *in vitro* drug release tests at 35°C and pH 7.4 isotonic phosphate buffer. The *in vitro* release profiles of besifloxacin HCl are shown in Figure 4. Examining the release patterns of the formulations K1, K2, and K3 for besifloxacin HCl revealed that some produced > 65 percent drug release, whereas K6 showed 58 percent release for two hours. The besifloxacin HCl had released 95% by the end of the sixth hour. As a result, the sixth hour was considered to be the last time the drug was released.

The findings demonstrate that the amount of medication burst released was lowered as poloxamer P407 concentration rose from 15 to 16%. These findings show that when the concentration of P407 rose, the gel's structure acted as a more formidable barrier to drug release. The decrease in the number and size of water channels and the rise in the number and size of micelles inside the gel structure may be the mechanisms causing this improved resistance [29]. Higher viscosity and a slower rate of drug release are a result of more cross-links between surrounding micelles due to the smaller intermicellar distance [30]. The rheology investigation that shows a direct correlation between gel concentration and viscosity may strengthen this idea [31].

The findings demonstrate that the amount of medication released was lowered as poloxamer P407 concentration rose. When polymer in the formulation is involved, analysis and modeling of medication releases become challenging. *In situ* gels are created using polymers that expand in water, such as poloxamer, HPMC, and HEC. These polymers release through a mechanism controlled by diffusion, erosion, or a combination of the two [32]. Utilizing the non-linear regression model of KinetDS, the drug release kinetics of besifloxacin HCl from *in situ* gels were determined. Table 4 lists the parameters and R2 determination coefficients (determination coefficients) that were determined using this method. Evaluation in the study was done using a variety of models, including zero-order, first-order, Hixson-Crowell, Higuchi, Weibull, and Korsmeyer-Peppas models. The release kinetics of besifloxacin HCl in all formulations follow the model established by Weibull when the regression coefficients are examined. The release data from swellable polymeric systems best fit the Weibull model, according to certain research that has been studied in the literature [33-35].

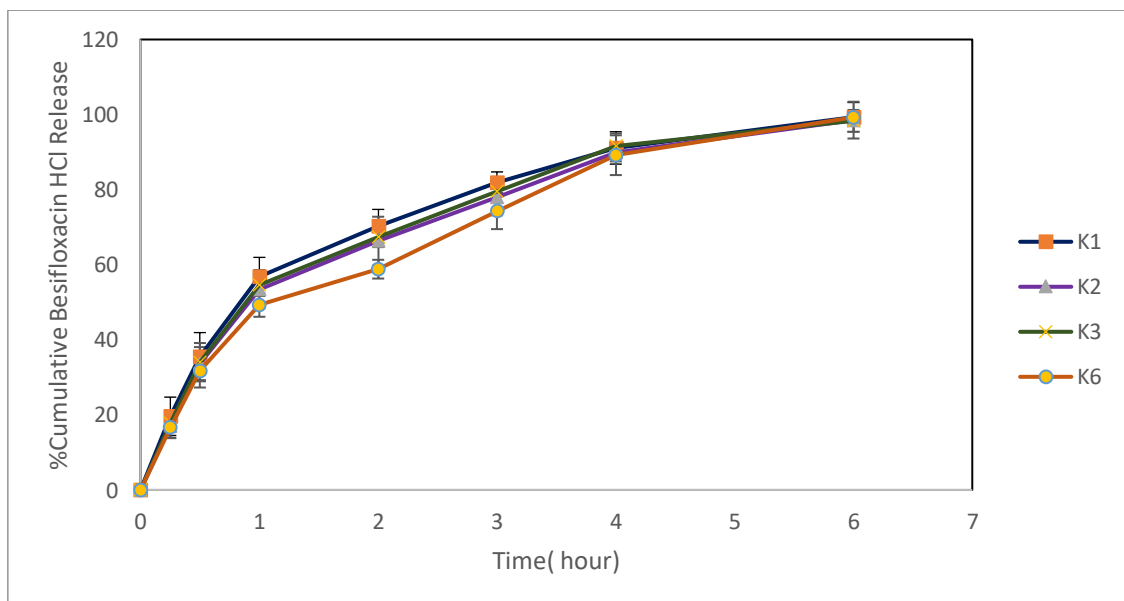




**Figure 3.** Drug loading given in percentages for Besifloxacin HCl (n=3)

**Table 4.** *In vitro* release kinetic parameters of besifloxacin from *in situ* gel

Sample	Zero Order (R <sup>2</sup> )	First Order (R <sup>2</sup> )	Higuchi (R <sup>2</sup> )	Korsmeyer-Peppas (R <sup>2</sup> )	Weibull (R <sup>2</sup> )	Hickson-Crowell (R <sup>2</sup> )
<b>K1</b>	0.8144	0.6880	0.7215	0.9618	0.9854	0.7351
<b>K2</b>	0.8151	0.6902	0.8007	0.9482	0.9931	0.7266
<b>K3</b>	0.8042	0.6826	0.7984	0.9621	0.9954	0.7232
<b>K6</b>	0.8002	0.6571	0.7975	0.9447	0.9889	0.7042



**Figure 4.** Cumulative release of besifloxacin HCl from *in situ* gel

In conclusion, as part of the investigation, multiple polymer solutions were made that had different concentrations of P407, P188, and the mucoadhesive polymers HPMC and HEC. All of these formulations underwent *in vitro* evaluation (pH, clarity, gelation temperatures, rheological behavior, and mucoadhesive tests). All formulations were discovered to exhibit a pseudoplastic flow resembling tears. The polymer ratios employed affect the corneal adhesion of each formulation, yet it can be seen that they are all at the intended level. When the gelation temperatures were compared to the poloxamer amounts, it was discovered that the gelation temperature dropped. K1, K2, K3, and K6 formulas were chosen because they gel at eye temperature. However, it was discovered that the pH of all formulations was close to 4. Since the pH range for ocular administration is between 4.0 and 7.4, it has been determined that the formulations won't irritate the eyes. Then, besifloxacin HCl was added to four formulations. These two formulations had a pH of 4.0, were gelled at a temperature between 35 and 34°C, and had pseudoplastic behavior. Additionally, it was shown that both formulations' drug loading capacities exceeded 97%. Four formulas, nevertheless, were made available for six hours. It is believed that increasing a medicine's interaction with its bioavailability may be increased by the ocular surface. Such medication includes besifloxacin HCl as an example. However, it is believed that conjunctivitis treatment success will be increased by co-administration with an antibiotic derivative. With these four formulations, the medication was released for a longer amount of time than with conventional eye drops, extending its residence time on the eye. The four formulations are therefore viewed as promising besifloxacin HCl drug delivery methods.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: H.K.P.; Design: H.K.P., S.Ü.; Control: H.K.P., S.Ü.; Sources: H.K.P., S.Ü.; Materials: H.K.P., S.Ü.; Data Collection and/or Processing: H.K.P., S.Ü.; Analysis and/or Interpretation: H.K.P., S.Ü.; Literature Review: H.K.P., S.Ü.; Manuscript Writing: H.K.P., S.Ü.; Critical Review: H.K.P., S.Ü.; 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. Lin, H.R., Sung, K.C. (2000). Carbopol/pluronic phase change solutions for ophthalmic drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 69(3), 379-388. [\[CrossRef\]](#)
2. Blondeau, J.M. (2004). Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Survey of Ophthalmology*, 49(2), S73-S78. [\[CrossRef\]](#)
3. Polat, H.K., Pehlivan, S., Özkul, C., Çalamak, S., Öztürk, N., Aytakin, E., Fırat, A., Ulubayram, K., Kocabeyoğlu, S., Irkeç, M., Çalış, S. (2020). Development of besifloxacin HCl loaded nanofibrous ocular inserts for the treatment of bacterial keratitis: *In vitro*, *ex vivo* and *in vivo* evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 585, 119552. [\[CrossRef\]](#)
4. Miller, D. (2013). Pharmacological treatment for infectious corneal ulcers. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 14(5), 543-560. [\[CrossRef\]](#)
5. Polat, H.K. (2022). Design of Metformin HCl and Moxifloxacin HCl Loaded Thermosensitive *In Situ* Gel. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 26(5), 1230-1241. [\[CrossRef\]](#)
6. Lee, V.H. (1990). New directions in the optimization of ocular drug delivery. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 6(2), 157-164. [\[CrossRef\]](#)
7. Polat, H.K. *In Situ* Gels Triggered by Temperature for Ocular Delivery of Dexamethasone and Dexamethasone/SBE- $\beta$ -CD Complex. *Journal of Research in Pharmacy*, 26(4), 873-883. [\[CrossRef\]](#)
8. Miyazaki, S., Yokouchi, C., Nakamura, T., Hashiguchi, N., Hou, W.M., Takada, M. (1986). Pluronic F-127 gels as a novel vehicle for rectal administration of indomethacin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 34(4), 1801-1808. [\[CrossRef\]](#)

9. Morishita, M., Barichello, J.M., Takayama, K., Chiba, Y., Tokiwa, S., Nagai, T. (2001). Pluronic® F-127 gels incorporating highly purified unsaturated fatty acids for buccal delivery of insulin. *International Journal of Pharmaceutics*, 212(2), 289-293. [\[CrossRef\]](#)
10. Dumortier, G., Grossiord, J.L., Agnely, F., Chaumeil, J.C. (2006). A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharmaceutical Research*, 23(12), 2709-2728. [\[CrossRef\]](#)
11. Chu, J.S., Amidon, G.L., Weiner, N.D., Goldberg, A.H. (1991). Mixture experimental design in the development of a mucoadhesive gel formulation. *Pharmaceutical Research*, 8(11), 1401-1407. [\[CrossRef\]](#)
12. Jones, D.S., Woolfson, A.D., Djokic, J., Coulter, W.A. (1996). Development and mechanical characterization of bioadhesive semi-solid, polymeric systems containing tetracycline for the treatment of periodontal diseases. *Pharmaceutical Research*, 13(11), 1734-1738. [\[CrossRef\]](#)
13. Morsi, N., Ghorab, D., Refai, H., Teba, H. (2016). Ketorolac tromethamine loaded nanodispersion incorporated into thermosensitive *in situ* gel for prolonged ocular delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 506(1-2), 57-67. [\[CrossRef\]](#)
14. Gugleva, V., Titeva, S., Ermenlieva, N., Tsibranska, S., Tcholakova, S., Rangelov, S., Momekova, D. (2020). Development and evaluation of doxycycline niosomal thermoresponsive *in situ* gel for ophthalmic delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 591, 120010. [\[CrossRef\]](#)
15. Schmolka, I.R. (1972). Artificial skin I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. *Journal of Biomedical Materials Research*, 6(6), 571-582. [\[CrossRef\]](#)
16. Ribeiro A, Figueiras A, Santos D, Veiga F. (2008). Preparation and solid-state characterization of inclusion complexes formed between miconazole and methyl- $\beta$ -cyclodextrin. *AAPS PharmSciTech*, 9, 1102-1109. [\[CrossRef\]](#)
17. Qi, H., Chen, W., Huang, C., Li, L., Chen, C., Li, W., Wu, C. (2007). Development of a poloxamer analogs/carbopol-based *in situ* gelling and mucoadhesive ophthalmic delivery system for puerarin. *International Journal of Pharmaceutics*, 337(1-2), 178-187. [\[CrossRef\]](#)
18. Singh, C.L., Singh, A., Kumar, S., Kumar, M., Sharma, P.K., Majumdar, D.K. (2015). Development and validation of different ultraviolet-spectrophotometric methods for the estimation of besifloxacin in different simulated body fluids. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77(4), 399. [\[CrossRef\]](#)
19. Karataş, A., Sonakin, O., Kiliçarslan, M., Baykara, T. (2009). Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) microparticles containing levobunolol HCl prepared by a multiple emulsion (W/O/W) solvent evaporation technique: Effects of some formulation parameters on microparticle characteristics. *Journal of Microencapsulation*, 26(1), 63-74. [\[CrossRef\]](#)
20. Thakor, S., Vhora, I., Desai, J., Thakkar, S., Thakkar, H. (2012). Physiologically activated phase transition systems for improved ocular retention of ketorolac tromethamine. *Journal of Pharmacy Bioallied Sciences*, 4(Suppl 1), S6. [\[CrossRef\]](#)
21. Patel, A., Cholkar, K., Agrahari, V., Mitra, A.K. (2013). Ocular drug delivery systems: An overview. *World Journal of Pharmacology*, 2(2), 47-64. [\[CrossRef\]](#)
22. Pawar, P., Katara, R., Mishra, S., Majumdar, D.K. (2013). Topical ocular delivery of fluoroquinolones. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 10(5), 691-711. [\[CrossRef\]](#)
23. Abd Elhady, S.S., Mortada, N.D., Awad, G.A., Zaki, N.M. (2003). Development of *in situ* gelling and muco adhesive mesberine hydrochloride solution for rectal administration. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 11, 159-171. [\[CrossRef\]](#)
24. Gilbert, J.C., Richardson, J.L., Davies, M.C., Palin, K.J., Hadgraft, J. (1987). The effect of solutes and polymers on the gelation properties of pluronic F-127 solutions for controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 5(2), 113-118. [\[CrossRef\]](#)
25. Shaikh, R., Singh, T.R.R., Garland, M.J., Woolfson, A.D., Donnelly, R.F. (2011). Mucoadhesive drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3(1), 89-100. [\[CrossRef\]](#)
26. Dantas, M.G.B., Reis, S.A.G.B., Damasceno, C.M.D., Rolim, L.A., Rolim-Neto, P.J., Carvalho, F.O., Almeida, J.R.G.D.S. (2016). Development and evaluation of stability of a gel formulation containing the monoterpene borneol. *The Scientific World Journal*, 2016, 7394685. [\[CrossRef\]](#)
27. Fathalla, Z.M., Vangala, A., Longman, M., Khaled, K.A., Hussein, A.K., El-Garhy, O.H., Alany, R.G. (2017). Poloxamer-based thermoresponsive ketorolac tromethamine *in situ* gel preparations: Design, characterisation, toxicity and transcorneal permeation studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 114, 119-134. [\[CrossRef\]](#)
28. Okur, N., Yozgatli, V., Okur, M.E. (2020). *In vitro*-*in vivo* evaluation of tetrahydrozoline-loaded ocular *in situ* gels on rabbits for allergic conjunctivitis management. *Drug Development Research*, 81(6), 716-727. [\[CrossRef\]](#)

29. Kurniawansyah, I.S., Rusdiana, T., Sopyan, I., Ramoko, H., Wahab, H.A., Subarnas, A. (2020). *In situ* ophthalmic gel forming systems of poloxamer 407 and hydroxypropyl methyl cellulose mixtures for sustained ocular delivery of chloramphenicol: Optimization study by factorial design. *Heliyon*, 6(11), e05365. [\[CrossRef\]](#)
30. Alexandridis, P., Hatton, T.A. (1995). Poly (ethylene oxide)-poly (propylene oxide)-poly (ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 96(1-2), 1-46. [\[CrossRef\]](#)
31. El-Kamel, A.H. (2002). *In vitro* and *in vivo* evaluation of Pluronic F127-based ocular delivery system for timolol maleate. *International Journal of Pharmaceutics*, 241(1), 47-55. [\[CrossRef\]](#)
32. Srivastava, M., Kohli, K., Ali, M. (2016). Formulation development of novel *in situ* nanoemulgel (NEG) of ketoprofen for the treatment of periodontitis. *Drug Delivery*, 23(1), 154-166. [\[CrossRef\]](#)
33. Öztürk Atar, K. (2022). Development and in-vitro characterization of l-cysteine loaded alginate beads for oral delivery. *Journal of Research In Pharmacy*, 26(1), 210-218. [\[CrossRef\]](#)
34. Ashrafi, H., Azadi, A. (2016). Chitosan-based hydrogel nanoparticle amazing behaviors during transmission electron microscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 84, 31-34. [\[CrossRef\]](#)
35. Jafari-Aghdam, N., Adibkia, K., Payab, S., Barzegar-Jalali, M., Parvizpur, A., Mohammadi, G., Sabzevari, A. (2016). Methylprednisolone acetate–Eudragit® RS100 electrospun: Preparation and physicochemical characterization. *Artificial cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(2), 497-503. [\[CrossRef\]](#)



## EGE BÖLGESİ'NDE YAYILIŞ GÖSTEREN *MARRUBIUM L.* (LAMIACEAE) TAKSONLARININ MORFOLOJİK VE MİKROMORFOLOJİK YÖNDEN İNCELENMESİ

*MORPHOLOGICAL AND MICROMORPHOLOGICAL INVESTIGATION OF MARRUBIUM  
L. (LAMIACEAE) TAXONS DISTRIBUTED IN THE AEGEAN REGION*

Tugce DEMIROZ AKBULUT<sup>1\*</sup> , Sura BAYKAN<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Ana Bilim Dalı, 35040, İzmir, Türkiye

### ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmada, Ege Bölgesi'nde yayılış gösteren 4'ü endemik olmak üzere 9 *Marrubium L.* taksonunun ve aynı taksonun farklı populasyonlarının mikromorfolojik ve morfolojik karakterleri bakımından kıyaslanması amaçlanmıştır. Ayrıca, yurt dışında pek çok ilacın terkbine giren *M. vulgare*'nin ülkemizde yayılış gösteren populasyonlarının Avrupa Farmakopesi kriterlerine uygun olup olmadıklarını değerlendirmek hedeflenmiştir.

**Gereç ve Yöntem:** Morfolojik incelemelerde Türkiye Florası tayin anahtarında yer alan önemli yapılar ve Avrupa Farmakopesi kriterleri göz önünde bulundurularak makroskobik yapılar incelenmiş ve kaliks yapıları görüntülenmiştir. Mikromorfolojik incelemeler için de yine Avrupa Farmakopesi esas alınmıştır.

**Sonuç ve Tartışma:** Tüm taksonlarda farklı tipte örtü ve salgı tüyleri ile stoma, iletim demeti ve kollenkima gibi mikromorfolojik yapılar rastlanmıştır. *Marrubium parviflorum*'un iki alttürü ile endemik taksonlar *M. rotundifolium*, *M. globosum* subsp. *globosum* ve *M. bourgaei* subsp. *caricum*'un Türkiye Florası tayin anahtarına göre teşhis ve taksonomileri yönünden karışıklıklar olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 9 farklı lokaliteden toplanan *M. vulgare* populasyonu içerisinde 8 örnek Avrupa Farmakopesi'ne uygun bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Endemik, Lamiaceae, *Marrubium*, mikromorfoloji, morfoloji

### ABSTRACT

**Objective:** In this study was aimed to compare 9 *Marrubium L.* taxa, 4 of which are endemic, and different populations of the same taxon in terms of micromorphological and morphological characters, distributed in the Aegean Region. In addition, it was aimed to evaluate whether the

\* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Tugce Demiroz Akbulut  
e-posta / e-mail: demirozt@hotmail.com, Tel. / Phone: +902323114082

populations of *M. vulgare*, which is included in the composition of many drugs abroad, and which spread in our country, comply with the criteria of the European Pharmacopoeia.

**Material and Method:** In the morphological examinations, macroscopic structures were examined and calyx structures were visualized by considering the important structures in identification key in the Flora of Turkey and the European Pharmacopoeia criteria. Micromorphological examinations were based on the European Pharmacopoeia criterias.

**Result and Discussion:** Different types of non-glandular and glandular hairs and micromorphological structures such as stoma, vascular bundle and collenchyma were found in all taxa. Two subspecies of *Marrubium parviflorum* and endemic taxa *M. rotundifolium*, *M. globosum* subsp. *globosum* and *M. bourgaei* subsp. *caricum* according to the identification key in Flora of Turkey, there are confusions in terms of diagnosis and taxonomies. In addition, 8 samples of *M. vulgare* population collected from 9 different localities were found to be suitable for the European Pharmacopoeia.

**Keywords:** Endemic, Lamiaceae, *Marrubium*, micromorphology, morphology

## GİRİŞ

Dünyada 245 cins ve 7886 tür ile temsil edilen Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyası [1] başta Akdeniz ülkeleri olmak üzere Güney Amerika, Güney Batı Asya ve Avustralya'da yayılış göstermektedir. Bu familyanın ülkemizde 48 cins ve 782 taksonu mevcuttur [2,3]. Bu taksonlar Anadolu'da sırasıyla; Akdeniz (293 takson), İran-Turan (287 takson) ve Avrupa-Sibiryaya (90 takson) fitocoğrafik bölgelerinde yayılış göstermektedir [3]. Lamiaceae familyası üyelerinin baharat olarak, parfümeride ve eczacılıkta geniş kullanım alanları mevcuttur.

Kuzey Afrika, Asya ve Avrupa'da 49 cins ve 53 takson ile yayılış gösteren *Marrubium* L. (Lamiaceae) cinsi [4], Anadolu'da 16 tanesi endemik olmak üzere 27 takson ve 23 tür ile temsil edilmektedir (Tablo 1) [5–8]. İran-Turan kökenli olan cinsin, bu bölgedeki yayılışı (14 takson) Akdeniz fitocoğrafik bölgesinden (8 takson) fazla olmakla birlikte, endemizm oranı Akdeniz floristik bölgesinde (%88; İran-Turan bölgesindeki endemizm oranı: %71) daha yüksektir [3]. *Marrubium*, Doğu ve Güneydoğu Anadolu başta olmak üzere Ege, Akdeniz ve Karadeniz'de yayılış göstermekte ve Ege Bölgesi'nde, 6'sı endemik olmak üzere 11 takson (9 tür) ile temsil edilmektedir [5]. Endemizm oranının yüksek olmasına bağlı olarak (%59), bitkinin gen merkezinin Anadolu olduğu düşünülmektedir.

Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası'na göre; “*Marrubium* cinsi tek veya çok yıllık otsu bitkilere sahiptir. Yaprakları çok tüylü yapıdadır. Kaliksi ters konik, dar ve 5-10-30 dişlidir. Kaliks dişlerinin sayısı teşhiste oldukça önemli bir karakterdir: Bazı türlerde diş sayısı 10 veya daha fazla iken, bazılarında 5-7 veya 5'tir. Korollası ise sarı, beyaz veya mor renkli olup 2 dudaklıdır. 4 stamenin tamamı korollanın içindedir. Bu cinsin türlerinde tüylenme oldukça karmaşık olup, temelde yıldızsı tüyler vardır; ancak merkez dal çok uzunken, yan dallar oldukça kısadır. Bu nedenle indumentum çok yoğunsa tüyler basit tüy olarak algılanabilmektedir. Çoğu türde basit tüy yaprak üst yüzeyinde bulunmaktadır.”[9].

Farklı *Marrubium* türlerinin dünyada geleneksel olarak ateş düşürücü, öksürük kesici, iştah açıcı ve adet söktürücü amaçlarla kullanımı kayıtlıdır [10–12]. Benzer şekilde, Anadolu'da “Dağ çayı, Bozotu, Kalartopu, Yabaniderme” gibi isimlerle anılan *Marrubium* türlerinin toprak üstü kısımları, halk arasında soğuk algınlığında, ağrı kesici, ateş düşürücü, balgam söktürücü, adet söktürücü, karminatif ve diüretik etkilerine bağlı olarak kullanılmaktadır [13–16]. Bu türler içerisinde *M. vulgare* L.'nin öne çıkmasının en önemli nedeni; kuşkusuz bitkinin Antik Mısır'dan bu yana halk hekimliğinde kullanılmasıdır. M.S. 100 yılında Dioscorides “De Materia Medica” adlı kitabında, *M. vulgare*'nin göğüsten konjestif madde getirdiğini, yaraları ve ülserleri temizlediğini, doğumdan sonra, adet söktürücü ve ağrı kesici olarak kullanıldığını ifade etmektedir [17]. Günümüzde *M. vulgare*, EMA (Avrupa İlaç Ajansı), ESCOP (Avrupa Bilimsel Fitoterapi Birliği), Alman E Komisyonu gibi uluslararası farklı monograf ve farmakopelerin yanısıra, Avrupa ve Türk Farmakopesi'nde de “Bozotu-Marrubii herba” monografisi ile yer almaktadır [18–21]. Bitki, yurt dışında bitkisel çayların ve pastillerin terkibine girmekte ve ilaç endüstrisinde oldukça sık kullanılmaktadır. Bu nedenle ülkemizde geniş yayılış gösteren *M. vulgare* populasyonlarının yerli ilaç üretiminde potansiyellerinin

değerlendirilebilmesi için Avrupa Farmakopesi (A.F.) kriterlerine uygunluğu incelenmelidir.

Literatüre bakıldığında, dünyadaki 53 takson içerisinde sadece *M. vulgare* L., *M. anisodon* K. Koch, *M. astracanicum* Jacq., *M. parviflorum* Fisch.&C.A. Mey, *M. globosum* Montbret&Aucher ex. Benth., *M. bourgaei* Boiss., *M. trachyticum* Boiss., *M. lutescens* Boiss.&Heldr., *M. cephalanthum* Boiss. & Noë ve Bulgaristan endemiği *M. friwaldskyanum* Boiss. türlerinin anatomik, morfolojik ve genetik çalışmalarının yapıldığı gözlenmiştir [22–30]. Bununla beraber, Türkiye’de yayılış gösteren *Marrubium* türleri ile yapılan bir revizyon çalışmasında, Türkiye Florası tayin anahtarına göre *Marrubium* taksonlarının teşhislerinin oldukça karmaşık olduğu ve bu durumun tek lokaliteden toplanan tip örneklerinin deskripsiyonundan kaynaklandığı belirtilmiştir [31]. Özellikle endemik taksonlar *M. rotundifolium* Boiss., *M. bourgaei* subsp. *caricum* P.H. Davis ve *M. globosum* subsp. *globosum* ile *M. parviflorum* alttürlerinin benzerlik ve farklılıklarının ortaya konulmasının, bitkilerin taksonomik olarak sınıflandırılmasında yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, farklı *Marrubium* taksonlarının ve aynı taksonun farklı populasyonlarının makroskobik ve mikroskobik yapıları bakımından karşılaştırılması ve populasyon farklılığından kaynaklanabilecek varyasyonların belirlenmesi amacıyla, Ege Bölgesi’nde yayılış gösteren 4’ü endemik olmak üzere 9 *Marrubium* taksonunun (21 örnek) mikromorfolojik ve morfolojik karakterleri incelenmiş, 9 farklı lokaliteden toplanan *M. vulgare* örneklerinin Avrupa Farmakopesi kriterlerine uygunlukları araştırılmıştır.

### ***Marrubium* Tür Tayin Anahtarı**

1. Kaliks dişi 7-(-10)-30, genellikle kıvrık veya çengelli ve geniş yayılışlı
  2. Sert, kaliks dışının tüysüz uç kısmı, dişin total uzunluğun en az 1/3’ü kadar, floral yapraklar ovat, flabellat veya orbikular
  3. Kaliks dişleri kıvrık, alternat ve uzunlu kısısalı, uzun olanlar 3.5-5 mm.....**anisodon**
  3. Kaliks dişleri çengel veya halka şeklinde kıvrılmış, ± eşit, 1.5-2 mm.....**vulgare**
  2. Sert, kaliks dışının tüysüz uç kısmı çok kısa, dişin total uzunluğun 1/3’ünden daha kısa, floral yapraklar görece daha dar.
    4. Kaliks dişleri 15-30 ± tabanda birleşik, dişlerin arasındaki girintiler eşit değil.....**cuneatum**
    4. Kaliks dişleri 10-15, tabanda birleşik olma durumları belirgin değil, dişlerin aralarındaki girintiler eşit.....**parviflorum**
1. Kaliks dişleri 5-(-7), boyları eşit veya değil, genellikle düz ve dik (*M. parviflorum* subsp. *oligodon* hariç)
  5. Vertisilasterlerin çoğu başlara doğru yoğunlaşır, gövde veya kısa lateral dallar ile sonlanır; floral yapraklar ± sesil, oblong
  6. Çiçekli gövdeler dallanmamış, genelde tek başlı, kaliks tüpü 7 mm veya daha uzun, dişler 3 mm veya daha uzun, korolla 12-14 mm.....**cephalanthum**
  6. Çiçekli gövdeler kısa dallı, her dal ucunda yoğunlaşan vertisilasterler ile sonlanır, kaliks tüpü 5-7 mm, dişler 2-2.5 mm, korolla 10-11 mm.....**lutescens**
  5. Vertisilasterler genelde çok sayıda, gövde ve dallar boyunca aralarında boşluklar var, floral yapraklar yukarıdaki gibi değil
    7. Tek yıllık.....**catariifolium**
    7. Çok yıllık, çok gövdeli
      8. Korolla leylak rengi-mora doğru
        9. Gövdeler nadiren 25 cm’den uzun, çoğu tüy basit görümlü, merkezdeki tüy uzamış.....**cordatum**
        9. Gövde genellikle 25 cm’den uzun, tüylerin çoğu belirgin şekilde stellat (yıldızlı).....**astracanicum**
      8. Korolla beyaz, krem, sarımsı veya nadiren pembemsi

10. Vertisilasterler 1-çiçekli, uzun spikalar halinde ..... **depauperatum**
10. Vertisilasterler çok-çiçekli, spikalar halinde değil
11. Bitkiler genişçe ve çatalı dallanmış; kaliks dişleri genelde uca doğru yumuşak stellat tüylü ..... **peregrinum**
11. Bitkiler dallanmamış, veya çok az dallanmış, dik dallar; genellikle kaliks dişlerinin üstteki 1/3'ü veya 1/2'si tüysüz
12. Gövdede oldukça zayıf piloz tüyler ve 2 farklı boyda basit tüyler
13. Gövde 50 cm veya daha uzun; kaliks tüpü yeşilimsi, yaprakların üst yüzeyi basit tüylü ..... **vanense**
13. Gövdeler 20-30 cm, kaliks tüpü mor renkli ve yeşilimsi damarlı, yaprakların üst yüzeyi stellat tüylü..... **vulcanicum**
12. Gövdeler piloz ve stellat tüylü, stellat tüylerin merkez tüyleri bazen uzamış, fakat hepsi ± eşit
14. Kaliks dişleri ± silindirik, geniş yayılışlı, neredeyse uca kadar yumuşak stellat tüylü..... **parviflorum subsp. oligodon**
14. Kaliks dişleri ± düz veya subulat ince uzun, dik veya hafif yayılmış, uçtaki 1/3 veya 1/2'lik kısım tüysüz
15. Kaliks dişleri 3-4 mm, yapraklar yumuşak yoğun basık stellat tüylü, basit görünümlü tüy yok..... **heterodon**
15. Kaliks dişleri 1-2.5 mm, yapraklarda tüy tipleri çeşitli; genellikle en azından üst kısımda basit görünüşlü tüyler var
16. Tüyler parlak kızılımsı-sarı; kaliks dişleri sert, yumuşak stellat tüylü..... **bourgaei**
16. Tüyler beyazımsı veya gri; kaliks dişleri sert değil
17. Kaulin yapraklar 35-42x26-40 mm..... **rotundifolium**
17. Kaulin yapraklar daha küçük
18. Kaulin yapraklar oblong-oblanseolat, genelde grimsi, kaliks tüpü 5-6 mm, dişler hafif yayılmış..... **trachyticum**
18. Kaulin yapraklar oblong-eliptik, geniş eliptik veya orbikular, genelde beyazımsı, kaliks tüpü 3.5-4.5 (-5) mm, dişler dik..... **globosum**
- M. astracanicum:**
1. Kaliks dişleri (1.0)-1.5-2-(2.5) mm..... **subsp. astracanicum**
1. Kaliks dişleri 3-4 mm..... **subsp. macrodon**
- M. bourgaei:**
1. Gövde 15-30 cm, kaliks dişleri dik, bazal yapraklarda indumentum parlamaz..... **subsp. bourgaei**
1. Gövde 30-40 cm, kaliks dişleri yayılmış, bazal yapraklarda indumentum parlar..... **subsp. caricum**
- M. globosum:**
1. Bütün vertisilasterler sesil..... **subsp. globosum**
1. En azından alt kısımlardaki vertisilasterler pedunkulat..... **micranthum**
- M. parviflorum:**
1. Kaliks dişleri 5-(-8), 5'ten fazla olduğunda eşit değil..... **subsp. oligodon**
1. Kaliks dişleri 10-15 veya daha fazla, hepsi ± eşit..... **subsp. Parviflorum**



**Tablo 1.** Türkiye’de yayılış gösteren *Marrubium* taksonları, endemizm ve tehlike durumları

No	Tür	Takson	Türkçe Adı	Endemizm (E)	Tehlike Kategorisi	Yayılış
1	<i>M. amasiensis</i> Akgül & Ketenoğlu			E		Amasya
2	<i>M. anisodon</i> Koch*		Yayotu			Batı Karadeniz Bölümü İç Batı Anadolu Bölümü Antalya Bölümü Hakkari Bölümü
3	<i>M. astracanicum</i>	subsp. <i>astracanicum</i> Jacq.*	Mor yayotu			G. Marmara Bölümü Karadeniz Bölgesi Y. Sakarya Bölümü D. Anadolu Bölgesi Akdeniz Bölgesi
4		subsp. <i>macrodon</i> P.H. Davis*	Koca yayotu	E	LC	Ege Bölgesi Y. Fırat Bölümü Antalya Bölümü
5	<i>M. bourgaei</i>	subsp. <i>bourgaei</i> Boiss.	Bozkaşık	E	NT	Antalya Bölümü
6		subsp. <i>caricum</i> P.H. Davis*	Akkaşık	E	CR	Asıl Ege Bölümü
7	<i>M. catariifolium</i> Desr.		Boz yayotu			Erzurum-Kars Bölümü
8	<i>M. cephalanthum</i> Boiss. & Noë*		Başlı bozot	E	LC	O. Karadeniz Bölümü O. ve Y. Kızılırmak Bölümleri Adana Bölümü
		subsp. <i>montanum</i> Akgül&Ketenoğlu		E		Amasya
9	<i>M. cordatum</i> Nábelek		Yayla Dermesi			Y. Murat-Van Bölümü Hakkari Bölümü G.D. Anadolu Bölümü
10	<i>M. cuneatum</i> Banks&Sol.		Elkurtaran			Y. Fırat Bölümü Y. Murat-Van Bölümü Hakkari Bölümü G.D. Anadolu Bölümü
11	<i>M. depeauperatum</i> Boiss.&Balansa		Yoksulderme	E	DD	O. Kızılırmak Bölümü
12	<i>M. eriocephalum</i> Seybold			E		Van-İspiriz Dağı

**Tablo 1 (devamı).** Türkiye’de yayılış gösteren *Marrubium* taksonları, endemizm ve tehlike durumları

13	<i>M. globosum</i>	subsp. <i>globosum</i> Montbret&Aucher ex. Benth.*	Bozcaboğan	E	LC	O. Karadeniz Bölümü Asıl Ege Bölümü O. ve Y. Kızılırmak Bölgeleri Y. Fırat Bölümü Akdeniz Bölgesi G.D. Anadolu Bölgesi
14	<i>M. heterodon</i> Boiss.&Balansa		Köşeli Bozotu	E	LC	O. Karadeniz Bölümü Akdeniz Bölgesi
15	<i>M. lutescens</i>	subsp. <i>lutescens</i> Boiss.&Heldr.*	Sarıderme	E	LC	Ege Bölgesi Konya Bölümü Akdeniz Bölgesi
16		subsp. <i>micranthum</i> (Boiss &Heldr.) P.H.Davis <sup>a</sup>	Akderme	E	NT	Akdeniz Bölgesi
17	<i>M. parviflorum</i>	subsp. <i>oligodon</i> (Boiss.) Seybold*	Küllü Bozotu	E	LC	İç Batı Anadolu Bölgesi Y. Sakarya Bölümü O. Kızılırmak Bölümü Erzurum-Kars Bölümü Y. Murat-Van Bölümü O. Fırat Bölümü
18		subsp. <i>parviflorum</i> Fisch.&C.A. Mey*	Bozotu			Türkiye (İran-Turan Elementi)
19	<i>M. peregrinum</i> L.*		Yabani derme			Marmara Bölgesi Asıl Ege Bölümü
20	<i>M. persicum</i> C.A.Mey		Tuzcaboğum		VU	Erzurum-Kars Bölümü
21	<i>M. rotundifolium</i> Boiss.*		Kalartopu	E		Asıl Ege Bölümü
22	<i>M. sivasense</i> Aytaç, Akgül&Ekici		Kukasotu	E		Y. Kızılırmak Bölümü
23	<i>M. trachyticum</i> Boiss.		İtsineği	E	NT	O. Karadeniz Bölümü, Y. Sakarya ve Y. Kızılırmak Bölgeleri
24	<i>M. vanense</i> Hub-Mor.		Van dermesi	E	EN	Y. Murat – Van Bölümü
25	<i>M. vulcanicum</i> Hub- Mor.		Ağrı dermesi	E	VU	Y. Murat – Van Bölümü

**Tablo 1 (devamı).** Türkiye’de yayılış gösteren *Marrubium* taksonları, endemizm ve tehlike durumları

26	<i>M. vulgare</i> L.*		Karaderme			G. Marmara Bölümü, Batı Karadeniz Bölümü, Ege Bölgesi, Akdeniz Bölgesi, O. Fırat Bölümü
27	<i>M. yildirimlii</i> Akgül & B. Selvi			E		Isparta

**Kaynaklar:** [5–8] \*Ege Bölgesi’nde yayılış gösteren tür/taksonlar <sup>a</sup> Flora of Turkey’de *M. globosum* ssp. *micranthum* olarak yer alan takson, bu kaynakta *M. lutescens* ssp. *micranthum* olarak güncellenmiştir. **LC:** Düşük riskli; **NT:** Tehdide yakın; **CR:** Kritik; **DD:** Yetersiz veri; **VU:** Duyarlı; **EN:** Tehlikede

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Bitkisel Materyal

2018 yılının Haziran-Ağustos aylarında Ege Bölgesi’ndeki 21 farklı lokaliteden 4’ü endemik olmak üzere 9 *Marrubium* taksonu toplanmıştır (Şekil 1). Arazi çalışmaları için, Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü’nden gerekli izin alınmıştır (Belge No. 72784983-488.04-135928).

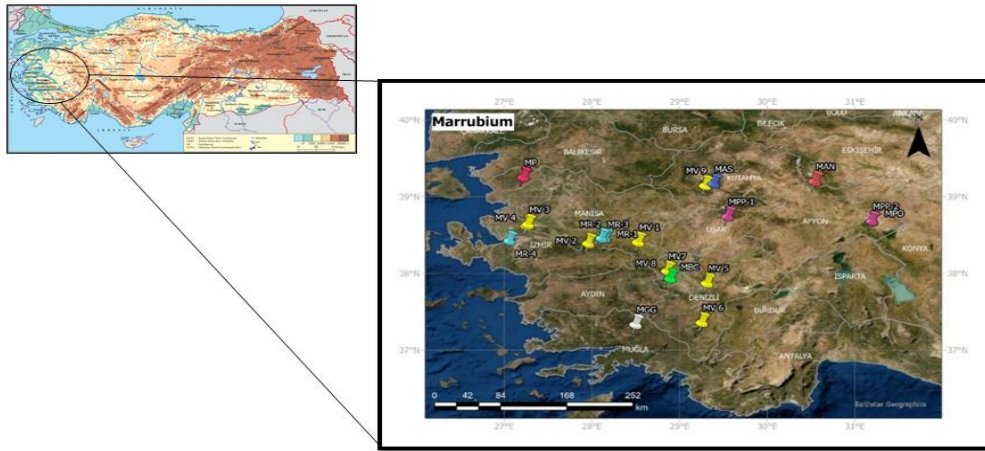
Bitkiler toplandıktan sonra kurutma kabinlerinde düzenli hava akışı ile kurutulmuştur. Ayrıca tüm lokalitelere ait popülasyonlardan herbaryum örnekleri hazırlanmış, IZEF Herbaryumu’na kaydedilmiş ve herbaryum numaraları verilmiştir (Tablo 2). Bitkiler, ekibimiz ve Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik ABD.’de görevli Prof. Dr. Serdar Gökhan Şenol tarafından “Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası” tayin anahtarı [9] kullanılarak teşhis edilmiştir.

**Tablo 2.** Toplanan *Marrubium* Örnekleri ve Herbaryum Numaraları.

Sıra No	Takson	Kod	Açıklama
1	<i>M. anisodon</i>	MAN	3b. Afyon: İhsaniye; Demirli Köyü. 08.06.2018 (IZEF no. 6602)
2	<i>M. astracanicum</i> subsp. <i>astracanicum</i>	MAS	3b. Kütahya: Gediz; Yumrutaş Köyü, 1224 m. 39° 2' 41" K, 29° 21' 8" D, 28.07.2018 (IZEF no. 6595)
3	<i>M. bourgaei</i> subsp. <i>caricum</i>	MBC	3a. Denizli: Babadağ; Kızılcabölük üstü. Hacı Emir düzlüğü, kar çukurları, 1950 m. Temmuz 2018 (IZEF no. 6599)
4	<i>M. globosum</i> subsp. <i>globosum</i>	MGG	3a. Muğla: Merkez; Muğla’dan Tavas’a giderken, Yılanlı Dağı, 1341 m. 37° 12' 46" K, 28° 27' 44" D, 14.06.2018 (IZEF no. 6585)
5	<i>M. parviflorum</i> subsp. <i>parviflorum</i>	MPP-1	3b. Uşak: Merkez; Yapağlar Köyü girişi. Yol kenarı buğday tarlası içi, 958 m. 38° 37' 10" K, 29° 30' 43" D, 26.06.2018 (IZEF no. 6589)
6		MPP-2	3b. Afyon: Çay; Deresinek Köyü. Haziran 2018 (IZEF no. 6601)
7	<i>M. parviflorum</i> subsp. <i>oligodon</i>	MPO	3b. Afyon: Çay; Deresinek Köyü. Haziran 2018 (IZEF no. 6600)
8	<i>M. peregrinum</i>	MP	3a. İzmir: Bergama; Akropolis harabeleri, 250 m. 12.06.2018 (IZEF no. 6584)

**Tablo 2 (devamı).** Toplanan *Marrubium* Örnekleri ve Herbaryum Numaraları.

9	<i>M. rotundifolium</i>	MR-1	3a. İzmir: Ödemiş; Bozdağ- Kayak merkezine giderken yol kenarı, 1258 m. (1 nolu lokalite) 38° 20' 55" K, 28° 05' 16" D, 29.07.2018 (IZEF no. 6597)
10		MR-2	3a. İzmir: Ödemiş; Bozdağ- Kayak merkezine varmadan, 1534 m. (2 nolu lokalite) 38° 20' 14" K, 28° 06' 31" D, 29.07.2018 (IZEF no. 6598)
11		MR-3	3a. İzmir: Ödemiş; Bozdağ- 1150 m. (3 nolu lokalite) 26.06.2018 (IZEF no. 6052)
12		MR-4	3a. İzmir: Kemalpaşa; Nif Dağı- Alabalık çiftliğine gelmeden, 820 m, yol kenarı düz alan. 06.06.2018 (IZEF no. 6603)
13	<i>M. vulgare</i>	MV-1	3a. Manisa: Alaşehir; Osmaniye Köyü yakınları. 540 m. 38°17'08" K, 28 ° 29' 27" D, 29.07.2018 (IZEF no.6596)
14		MV-2	3a. İzmir: Ödemiş; Dereuzunyer Köyü. 305 m. 06.06.2018 (IZEF no. 6605)
15		MV-3	3a. İzmir: Bornova; Kayadibi Köyü. 566 m. 38° 31' 02" K, 27 ° 14' 08" D, 23.06.2018 (IZEF no. 6588)
16		MV-4	3a. İzmir: Bornova; Eğridere Köyü içi, köy mezarlığı karşısı. 418 m. 38° 30' 04" K, 27 ° 12' 56" D, 23.06.2018 (IZEF no. 6586)
17		MV-5	3a. Denizli: Honaz; Güney Köyü, 940 m. 37°45'02" K, 29°16'37" D, 30.06.2018 (IZEF no. 6590)
18		MV-6	6a. Denizli: Olukbaşı; Geyran Yaylası, 1450 m. 37° 14' 12" K, 29° 13' 03" D, 30.06.2018 (IZEF no. 6591)
19		MV-7	3a. Denizli: Tırkaz; Sarayköy, Aşağı Tırkaz Köyü, 277 m. 37° 54' 29" K, 28° 49' 23" D, 30.06.2018 (IZEF no. 6593)
20		MV-8	3a. Denizli: Tırkaz; Sarayköy, Aşağı Tırkaz Köyü, 321 m. 37° 54' 23" K, 28° 49' 05" D, 30.06.2018 (IZEF no. 6592)
21		MV-9	3b. Kütahya: Gediz; Şaphane Dağı Ayvacık Köyü. 1264 m. 39° 01' 24" K, 29° 15' 19" D, 28.07.2018 (IZEF no. 6594)

**Şekil 1.** Ege Bölgesi'nden toplanan *Marrubium* taksonlarına ait lokaliteler <sup>32,33</sup>

### Morfolojik Çalışmalar:

*Marrubium* türlerinin tayininde karakteristik olarak kabul edilen yapı, kalıktır. Bu nedenle tüm örneklerin kaliks yapıları ve brakteelleri görüntülenmiştir. Ayrıca örnekler, Türkiye Florası'nda yer alan *Marrubium* tür tayin anahtarındaki karakteristik yapıları bakımından incelenmiştir (Euromex Loop) [9]. Bu yapılar şöyledir:

- Gövde boyu
- Kaulin yaprak şekil ve büyüklüğü
- Kaliks boyu
- Kaliks diş sayısı, diş uzunluğu ve dişlerin boylarının eşit olup olmaması
- Kaliks dişlerinin çengelli-kavisli/geniş yayılışlı/dik duruşlu olması
- Korolla boyu ve rengi

Ayrıca çalışmamızda yer alan *M. vulgare* örnekleri, Avrupa Farmakopesi'ndeki (A.F.) "Marrubii herba" monografında geçen "gövde 50 cm'e varan uzunlukta, 4 köşeli, 7 mm genişlikte, genç sürgünler beyazımsı, ince, kısa tüylerle kaplı, daha yaşlı sürgünler yeşilimsi-gri ve daha az tüylüdür. Altta ki yapraklar genişlemiş ovattan orbikulara değişen, üstteki yapraklar daha az genişlemiş ovat, her ikisi de petiolat; lamina 1.5-4 cm uzunlukta, 1-3.5 cm genişlikte, apeks sub-akut, tabanda daralan veya kimi zaman kordat, laminanın kenarı dentat veya krenat, petiol 3 cm uzunlukta; damarlanma pennat, alt yüzeyde belirgin, üstte hafif bastırılmış görünümdedir. Yaprığın her iki yüzü de ince, beyaz, yünüsü tüylerle kaplı, ergin yapraklar koyu grimsi-yeşil üst yüzeyinde daha az tüylüdür. Çiçekler küçük, yaprak koltuğundan çıkan demetler halinde, sık ve sapsızdır. Kaliks 5 mm boyunda, kalıcı, 5'i uzun, 5'i kısa, karşılıklı, çengel veya eksenli saçak şeklinde kıvrılmış; kaliks tüpü içte uzun ipeksi tüyler taşıyan çember içeren; korolla 7 mm uzunlukta, donuk beyaz, 4 loblu, üst lop 2-dudaklı, alt lop 3-dudaklı; 4 kısa stamene sahip, stilus ikiye ayrılmış (bifid) stigmalıdır." [20] ifadesine istinaden aşağıda belirtilen makroskopik kriterler açısından incelenmiştir:

- Gövde boyu ve genişliği
- Genç ve yaşlı sürgünlerin renk ve tüylenme durumları
- Alt ve üst yaprak şekilleri
- Yaprak laminasının uzunluk ve genişliği
- Laminanın ucu, kenarı ve tabanı
- Petiyol uzunluğu
- Yaprak alt ve üst yüzeylerindeki tüylenme durumları
- Kaliks boy ve kaliks dişlerinin şekilleri (çengel, geniş yayılışlı gibi)
- Kaliks tüpünün tüylülük durumu
- Korolla boyu

### Mikromorfolojik Çalışmalar:

Avrupa Farmakopesi'ne göre mikrokosmik incelemeler için "drog (topraküstü kısımlar) toz edilir. Toz grimsi-yeşildir. Mikroskopta kloralhidrat kullanılarak incelenir. Toz aşağıdaki ayırıcı özellikleri gösterir: girintili-çıkıntılı, çok köşeli epiderma hücreleri ve alt epidermada daha çok sayıda diastik stoma içeren yaprak epidermasına ait parçalar, iğne veya druz şeklinde kalsiyum okzalit kristalleri taşıyan mezofil; çok sayıda 100-200 µm uzunlukta, tek veya çok hücreli ve 2-6 hücreden oluşan tek sıralı, boğum yerlerinde şişkin, kıvrılmış ve helezoni örtü tüyleri; yıldız tüyler 2 tip, bazıları kısa tek hücreli bir saptan çıkan 15-20 dala ayrılmış, diğerleri sesil bir tabandan çıkan daha az dallanmış; salgı tüyleri lamiaceae tipi, 8 hücreli; 1-2 hücreli sap ve 1-4 hücreli başı olan salgı tüyleri; kaliksin iç yüzünde 1000 µm uzunlukta 2-3 hücreli, şişkin, eklem yerlerinde kalınlaşmış, üst hücreleri uzamış örtü tüyleri; küre şeklindeki polenler 25 µm çapında, düz eksenli; gövde ve damarlardan gelen iletim demetleri içerir." [20]. Buna bağlı olarak gerçekleştirdiğimiz mikromorfolojik incelemelerde; tüm örnekler toz drog haline getirilmiş ve kloralhidrat reaktifi ile yine A.F.'ye göre aşağıdaki kriterler bakımından incelenmiştir:

- Diastik stoma (DS)
- Stellat (yıldızsı) tüy (YT)
- Piloze ve uzun örtü tüyleri (UT)

- Peltat (Labiatae tip) salgı tüyü (PT)
- Kapitit salgı tüyü (KT)

İncelemeler Olympus CKX41 inverted mikroskop ve Olympus SC50 kamera ile gerçekleştirilmiş olup, Olympus cellSens Entry yazılımıyla görüntülenmiştir.

## SONUÇ VE TARTIŞMA

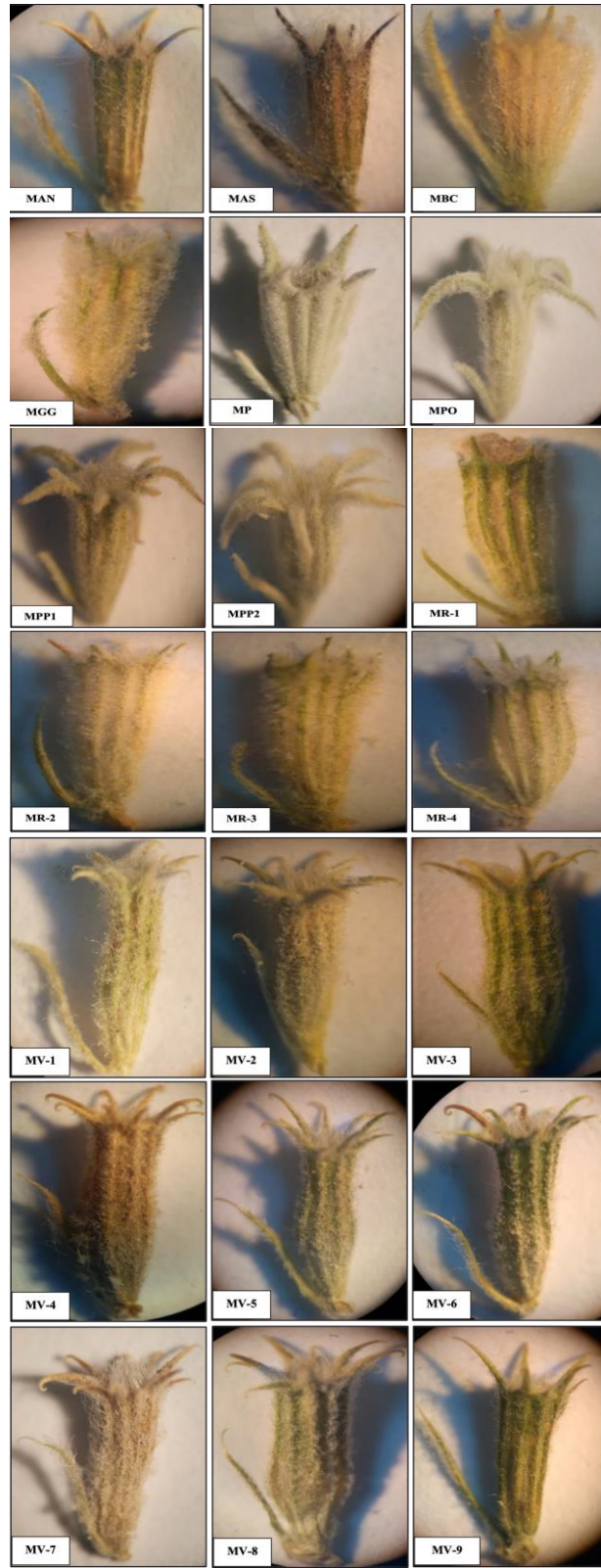
Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası'nda [9] pek çok *Marrubium* türünün yalnızca tek bir lokaliteden toplanan tip örnekleri ile deskripsiyonlarının yapılması, *Marrubium* taksonlarında görülebilecek olası varyasyonların gözden kaçırılmasına ve bitkinin yanlış teşhis edilmesine neden olabilmektedir. Buna bağlı olarak, bu çalışmada, farklı lokalitelerden toplanan bazı taksonların makroskobik ve mikroskobik yapıları bakımından karşılaştırılması hedeflenmiştir. Ayrıca taksonlar arasındaki benzerlik ve farklılıkların ortaya konulması ile teşhiste kolaylık sağlanması amaçlanmıştır.

*Marrubium* türleri arasında öne çıkan ve halk arasındaki kullanımı milattan önceye dayanan *M. vulgare*, ülkemizde geniş yayılışa sahiptir ve yurt dışında çeşitli preparatların terkbine girmektedir. Bitki, EMA, ESCOP ve Avrupa Farmakopesi gibi pek çok uluslararası monograf ve farmakopede yer almakta ve bu kaynaklarda özellikle soğuk algınlığına bağlı öksürük ve dispeptik rahatsızlıkların tedavisinde kullanımı onaylanmaktadır [18,19,21]. Ülkemizde yayılış gösteren *M. vulgare* populasyonlarının farmakope kriterlerine uygun olması, bitkinin kültüre alınması ve yerli ilaç üretiminde kaynak olarak kullanılabilmesi için ilk adımdır. Bu bağlamda Ege Bölgesi'ndeki 9 farklı lokaliteden toplanan *M. vulgare* örneklerinin makroskobik ve mikroskobik incelemeleri Avrupa Farmakopesi (A.F.) kriterleri esas alınarak gerçekleştirilmiştir [34]. Bulgular, sadece Kütahya'dan toplanan MV-9 örneğinin A.F.'ye uygun olmadığını göstermektedir.

*Marrubium* tür tayin anahtarına göre [9], teşhiste en önemli yapı; kalikstir. Kaliks dişlerinin sayısı, şekli, dikenli yapısının bulunması/bulunmaması, dik/geriye kıvrık oluşu tür ayrımlarında önemlidir. Bu durum 2004 yılında *Marrubium* cinsinin revizyon çalışmalarının gerçekleştirildiği bir doktora tezinde de belirtilmiştir [31]. Söz konusu revizyonda, brakteollerin genellikle her bir çiçek için bir tane olduğu ifade edilmiş ve brakteol ile kaliks uzunlukları arasında yer yer kıyaslamalar yapılmıştır. Buna bağlı olarak kaliks ve brakteol yapıları Şekil 2'de birlikte görüntülenmiştir.

Taksonların ve aynı taksona ait farklı populasyon örneklerinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen morfolojik incelemelerde ise, *Marrubium* tür tayin anahtarında [9] öne çıkan karakterler esas alınmış; örneklerin gövde boyu, kaulin yapraklarının şekil ve büyüklükleri, kalikslerinin farklı özellikleri ile korolla boyları ve renkleri incelenmiştir (Tablo 3). Bununla beraber, Avrupa Farmakopesi'nde (A.F.) "Marrubii herba" adıyla monografi bulunan *M. vulgare* örnekleri A.F. kriterlerine göre ayrıca değerlendirilmiş ve bulgular Tablo 4'te sunulmuştur.

Metcalfe ve Chalk'e göre, Lamaiceae familyasında trikrom özellikleri taksonomik açıdan önemlidir. Yazarlar, *Marrubium* cinsinde örtü tüylerinin dallanmış ve çok hücreli iken; kısa saplı ve 4 hücreli salgı tüylerinin bazen, baş kısmında çok sayıda hücre bulunan tüylerle karışık halde bulunduğunu beyan etmişlerdir [35]. Benzer şekilde Türkiye Florası tayin anahtarında da pek çok *Marrubium* taksonunun teşhisinde trikrom yapısı önem arz etmektedir. Burada, *Marrubium*'un yıldızsı (stellat) tüyler yönünden zengin olduğu belirtilmiş; ancak bu cinsten görülen tüy tipleri detaylı olarak verilmemiştir. *Marrubium* türleri ile gerçekleştirilen revizyon çalışmasında ise cinsin genellikle yıldızsı, marrubiuoid veya şamdan (dendroid) tüy taşıdığı, bitkilerin gövde kısımlarında daha çok marrubiuoid tüy gözlenirken, yapraklarında yıldızsı tüye rastlandığı rapor edilmiştir [31]. Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen mikroskobik incelemelerde ise, A.F. kriterleri esas alınmış ve bitkilerin toprak üstü kısımları toz edilmiştir. Tüm örneklerin grimsi-yeşil renkte ve tüylü yapıda oldukları gözlenmiştir. Bunlar arasında özellikle endemik MBC, MGG ve MR örneklerinin yoğun tüylenme gösterdikleri dikkat çekmiştir. İncelemeler sonucunda pek çok örnekte basit örtü tüyü (BÖT), yıldızsı (YT), şamdan (ŞT) ve kapitit salgı tüyü (KT) ile peltat (Labiatae tip) salgı tüyüne (PT) rastlanmıştır. Hem revizyon çalışmasında hem de Türkiye Florası'nda belirtilen "gövdedeki yıldızsı tüylerde merkez dalın uzamış olması (mono-radial tüy)" hali, çalışma kapsamında incelenen pek çok örnekte gözlenmiştir (Şekil 13 ve Şekil 15). Bu durum daha önce farklı *Marrubium* türlerinde de tespit edilmiş ve cinsin karakteristik özelliği olduğu ortaya konulmuştur [22].



Şekil 2 *Marrubium* taksonlarına ait kaliks yapıları (3x)





**Tablo 4 (devamı).** *M. vulgare* örneklerinin Avrupa Farmakopesi'ne göre morfolojik incelenmesi

Yaşlı Sürgün	Yeşilimsi-gri, daha az tüylü	Koyu yeşilimsi-gri, daha az tüylü değil	Yeşilimsi-gri, aynı oranda tüylenme	Yeşilimsi-gri, daha az tüylü değil	Yeşilimsi-gri, daha az tüylü değil	Koyu yeşilimsi-gri, daha az tüylü değil	Koyu yeşilimsi-gri, daha az tüylü değil	Yeşilimsi-gri, daha az tüylü değil	Yeşilimsi-gri, daha az tüylü değil	Koyu yeşil; aynı oranda tüylenme
<b>Alttaki Yaprak Şekli</b>	Genişlemiş ovat-orbikulat	Genişlemiş ovat	Genişlemiş ovat-orbikulat	Obovat	Obovat	Genişlemiş ovat	Genişlemiş ovat	Ovat	Ovat	Obovat
<b>Üstteki Yaprak Şekli</b>	Daha az genişlemiş ovat	Ovat	Genişlemiş ovat	Genişlemiş ovat	Ovat	Ovat-orbikulat	Ovat	Ovat	Ovat-orbikulat	Genişlemiş ovat
<b>Lamina Uzunluk ve Genişliği (cm)</b>	U: 1.5-4 G: 1-3.5	U: 0.5-1.5 G: 0.3-1.5	U: 0.5-2 G: 0.3-1.5	U: 1-1.3 G: 1-1.2	U: 0.5-1.0 G: 0.5-1.5	U: 0.5-2 G: 0.5-1.5	U: 1-2.5 G: 1-1.5	U: 1-2 G: 1-1.5	U: 1-2 G: 0.5-2	U: 0.5-3 G: 0.5-2.5
<b>Lamina Ücu/ Tabanı/ Kenarı</b>	<b>uç:</b> subakut <b>taban:</b> daralan (obtusa) veya bazen kordat <b>kenar:</b> dentat veya krenat	<b>uç:</b> subakut <b>taban:</b> kordat <b>kenar:</b> dentat (üst ve orta yaprak), krenat (alt yaprak)	<b>uç:</b> akut <b>taban:</b> obtusa <b>kenar:</b> krenat (alt ve üst yaprak)	<b>uç:</b> subakut <b>taban:</b> obtusa <b>kenar:</b> dentat (üst yaprak), krenat (alt yaprak)	<b>uç:</b> subakut <b>taban:</b> obtusa <b>kenar:</b> dentat (üst yaprak), krenat (alt yaprak)	<b>uç:</b> subakut <b>taban:</b> obtusa <b>kenar:</b> krenat	<b>uç:</b> subakut <b>taban:</b> obtusa <b>kenar:</b> krenat (alt ve üst yaprak)	<b>uç:</b> subakut <b>taban:</b> obtusa <b>kenar:</b> krenat (alt ve üst yapraklar)	<b>uç:</b> subakut, rotundat <b>taban:</b> obtusa, rotundat <b>kenar:</b> dentat (üst yaprak), krenat (alt yaprak)	<b>uç:</b> subakut <b>taban:</b> obtusa <b>kenar:</b> krenat
<b>Petiol Uzunluk (cm)</b>	3 cm'e kadar	< 2	0.5-1.5	< 1	0.5	0.7-1	0.3-0.5	1	0.5-2	0.5-3.5
<b>Alt ve Üst Yüzey Tüy Durumu</b>	iki yüzey ince, beyaz yünümü tüylerle kaplı; ergin yaprak koyu grimsi-yeşil, üst yüzeyde daha az tüylenme	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Üst yüzeyde daha yoğun tüylenme	Mevcut
<b>Kaliks Boy ve Şekli</b>	5 mm, 5 uzun-5 kısa karşılıklı, çengel veya ekseni saçak şeklinde kıvrılmış	5-6 mm	7 mm	6-7 mm	6-7 mm	7 mm	5-7 mm	5-7 mm	6 mm	7 mm; kaliks çengel değil
<b>Kaliks Tüpü</b>	içte uzun ipeksi tüyler taşıyan çember içerir	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut
<b>Korolla Boyu</b>	7 mm	5 mm	7 mm	7 mm	7 mm	5 mm	7 mm	7 mm	5 mm	6 mm

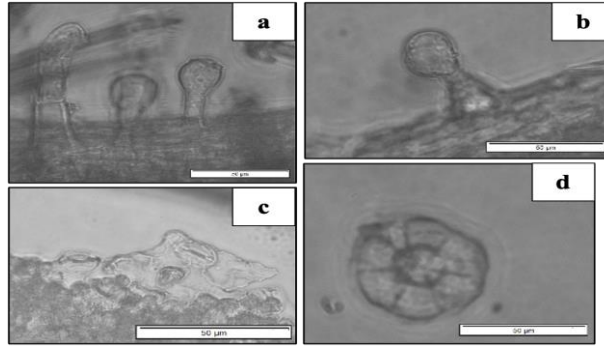
A.F. Avrupa Farmakopesi. U: Uzunluk, G: Genişlik

*Marrubium* türlerinde kapitat ve peltat olmak üzere iki farklı tipte salgı tüyü gözlenmektedir [28]. Revizyon çalışmasında, bu cinste kapitat tüylerin genellikle uzun ve belirgin saplı olduğu, sapların türler arasında oldukça farklılık gösterdiği ve genellikle çok hücreli olduğu tartışılmıştır. Bu çalışmada ise, örneklerin kapitat tüylerinin genellikle tek sap hücrelerine sahip olduğu gözlenmiş, kimi zaman çok hücreli salgı tüylerine de rastlanmıştır (Şekil 5 ve Şekil 12). Familya için karakteristik olan peltat tüyler ise yine farklı taksonlarda gözlenmiştir (Şekil 3 ve Şekil 8). Bu durum, *Marrubium* taksonları ile yapılan diğer çalışmalarda ortaya konulmuş, yazarlar bitkinin farklı kısımlarında peltat ve kapitat salgı tüylerine rastladığını rapor etmiştir [27–29].

*Marrubium* örneklerinde familya için karakteristik olan ve A.F. kriterlerinde yer alan diastik tip stoma (DS), iletim demeti (ID), kollenkima (KOL) ve uzun tüy (UT) yapıları gözlenmiştir (Şekil 5, Şekil 11 ve Şekil 12). Daha önce *M. lutescens*, *M. cephalanthum*, *M. trachyticum* ve *M. heterodon* gibi türlerle yapılan çalışmalarda ise, yapraklarda anomositik stomaya rastlandığı, yaprak ve gövde iletim

demetlerinin kolateral tipte olduğu (genellikle 2-3 sıralı) ve lamellar kollenkima bulunduğu rapor edilmiştir [25,27,36]. Bununla beraber, sadece revizyon çalışmasında ve A.F.’deki “Marrubii herba” monografında bahsi geçen uzun örtü tüyü (UT) [31,34] İzmir’den toplanan *M. vulgare* (MV-2, Şekil 5a) örneğinde gözlenmiştir.

*M. anisodon* (MAN) almaçlı olarak 5 kısa ve 5 uzun kaliks dişine sahiptir [9]. Bununla beraber, MAN örneğinde genellikle 5 kaliks dişi ile bazen daha kısa 2-3 kaliks dişi gözlenmiştir. Bu durum ilgili kaynaklarla örtüşmemekle birlikte; *Marrubium* türlerinde kaliks dişlerinde sıkça varyasyon görüldüğü ve bunun toprağın kalsiyum ve nem miktarı ile fiziksel özelliklerinden kaynaklandığı rapor edilmiştir [31]. MAN’ın kaliks tüpü (7 mm) Türkiye Florası’nda belirtilen boyutlardan (4.5-5 mm) daha büyük olmakla birlikte, revizyon çalışmasında yer alan ve İran’dan toplanan örneklerle uyumludur [31,37]. Bugüne kadar gerçekleştirilen anatomik çalışmalara ait bulgular da benzerlik göstermektedir. Örneğin; Anadolu’dan toplanan örnekte, yaprakta salgı ve örtü tüylerinin seyrek olarak bulunduğu belirtilirken, İran’daki farklı lokalitelerden toplanan örneklerde kapitat ve stipitat tüylerin kalikte yaprağa göre daha yoğun olarak gözlendiği ve bu türde sadece tek-sıralı stellat tüyler bulunduğu rapor edilmiştir [22,31]. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen mikromorfolojik incelemelerde ise bitkinin toprak üstü kısımlarında stomaların seyrek; kapitat ve peltat tüylerin ise çok yoğun olarak bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 3).



**Şekil 3.** MAN örneğine ait mikromorfolojik bulgular. **a** ve **b**. Kapitat tüyler, **c**. diasitik tip stoma, **d**. peltat tüy

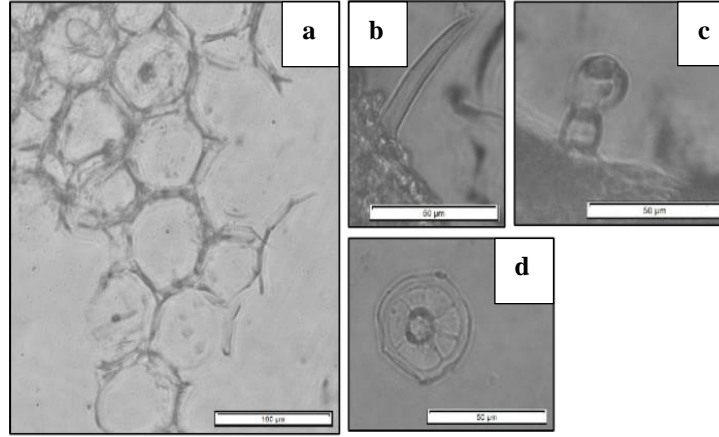
Taksonomik olarak *M. anisodon*’a en yakın tür, *M. vulgare* (MV)’dir. İki türde de 10 kaliks dişi bulunmakta; ancak *M. vulgare*’de eşit boyda olan kaliks dişleri zembereksi (çengel) şekilde geriye kıvrılmaktadır [9,31]. Talebi ve ekibinin iki türün gövde anatomisi üzerine gerçekleştirdikleri kümeleme analizi çalışmasında, türlerin farklı populasyonlarının aynı küme/alt-küme içerisinde olmaları, yani iki alt türün bazı populasyonlarının benzerlik göstermesi [38] iki tür arasında oldukça yakın bir evrimsel ilişki olduğunu doğrulamaktadır.

Çalışma kapsamında incelenen farklı *M. vulgare* örneklerinde, “Marrubii herba” monografında belirtilen mikroskopik yapılardan; peltat tüyler (Şekil 4d ve Şekil 9c), 1-2 hücreli sap ve 1-4 baş hücreli salgı tüyleri (Şekil 4c ve Şekil 10a) ve yıldızlı tüyler [sesil tabandan (Şekil 6a) veya kısa çok hücreli saptan çıkan tek/ 2-6 hücreli dallar (Şekil 8a ve Şekil 9a)] gözlenmiştir. Ayrıca monografında belirtilen kollenkima, iletim demeti ve diasitik stoma gibi yapılar (Şekil 4, Şekil 7, Şekil 11 ve Şekil 12) farklı MV populasyonlarında tespit edilmiş; ancak kalsiyum okzalat kristallerine rastlanmamıştır. İran’dan toplanan *M. vulgare* örneklerinin tüm morfolojik karakterlerinin (kaliks tüplerinin boyu, lamina ucu, kenarı, kaliks sayısı, korolla uzunluğu gibi) bulgularımızla uyumlu olmasının yanısıra [37], A.F. kriterlerine göre incelenen ve ticari/kültür/A.F.’ye uygun olduğu beyan edilen örneklerin tamamında gözlenen peltat salgı tüyü, diasitik tip stoma, tek ve çok hücreli örtü tüyleri ile stellat tüyler [39] bulgularımızı doğrulamaktadır.

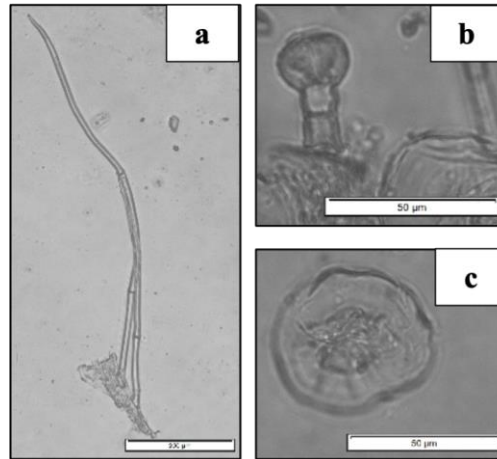
Tüm *M. vulgare* örneklerinin (MV) kaliks boylarının, Farmakope’de belirtilen kriterin (5 mm) üzerinde iken (5-7mm), korolla boylarının MV-1, MV-5 ve MV-8’de kriterin (7 mm) altında kaldığı gözlenmiştir (5-6 mm). MV-9 ise pek çok karakteri bakımından hem diğer MV örneklerinden hem de

A.F. standartlarından oldukça farklı ve genellikle büyük ölçülerdedir. Bu durum mikroskopik elementlerde de kendini göstermiş; stoma, örtü tüyü ve salgı tüyünün diğer MV örneklerine göre çok daha büyük yapılara sahip olduğu gözlenmiştir. Rakım ve iklim gibi çevresel parametrelerin morfolojik ve mikromorfolojik yapıları etkileyebileceği önceki çalışmalarda belirtilmiştir [22]. Kütahya örneğinin (MV-9) toplandığı rakımın diğer örneklerle [Manisa (MV-1), İzmir (MV-3 ve MV-4) ve Denizli (MV-5-8)] göre çok yüksek olduğu düşünüldüğünde, MV-9 örneğinin makroskopik ve mikroskopik elementlerinin diğer örneklerden daha büyük olma nedeni ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, bu örnekte çok yoğun şekilde tek sap hücreli salgı tüylerine rastlanması (Şekil 12a) başka bir önemli bulgudur.

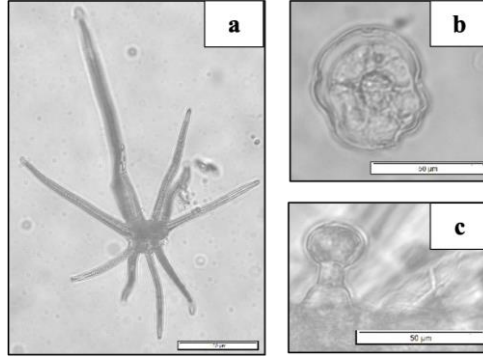
İzmir'den toplanan örnekler değerlendirildiğinde, MV-4 daha gelişmiş yapıda (daha büyük ve geniş gövde) olmasına rağmen, civar köyden toplanan MV-3, lamina büyüklüğü ve petiol uzunluğu bakımından daha büyük ölçülere sahiptir. Denizli'den toplanan örneklerden MV-5 birçok makroskopik karakter bakımından diğerlerine göre daha az gelişmişken, MV-6 gövde boyu ile ön plana çıkmaktadır. Aynı köyden toplanan MV-7 ve MV-8 örnekleri ise genel anlamda birbirine çok yakın özelliklerde olmakla birlikte, MV-8'in yapraklarının MV-7'den daha büyük olduğu gözlenmiştir. Bu farkların, bitkilerin yetiştiği mikroiklimsel koşullardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.



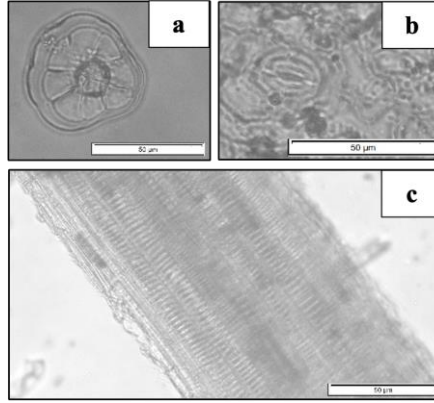
Şekil 4. MV-1 örneğine ait mikromorfolojik bulgular. **a.** Kollenkima, **b.** basit örtü tüyü, **c.** kapitat tüy, **d.** peltat tüy.



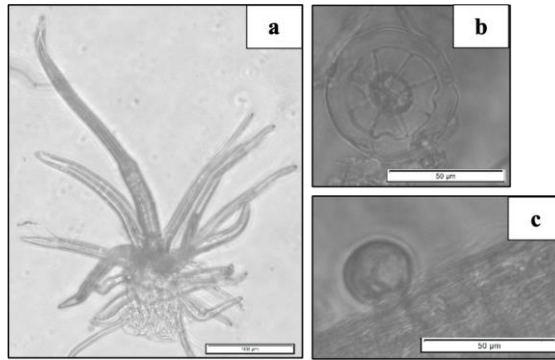
Şekil 5. MV-2 örneğine ait mikromorfolojik bulgular. **a.** Uzun örtü tüyü, **b.** kapitat tüy, **c.** peltat tüy.



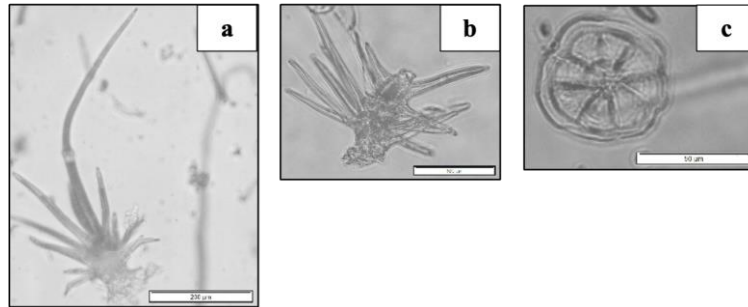
Şekil 6. MV-3 örneğine ait mikromorfolojik bulgular. **a.** Stellat tüy, **b.** peltat tüy, **c.** kapitat tüy.



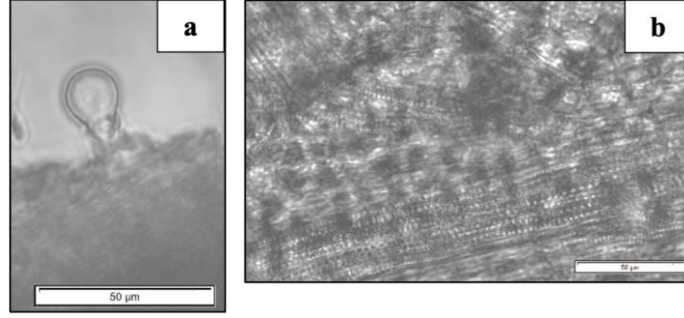
Şekil 7. MV-4 örneğine ait mikromorfolojik bulgular. **a.** Peltat tüy, **b.** diasitik tip stoma, **c.** İletim demeti.



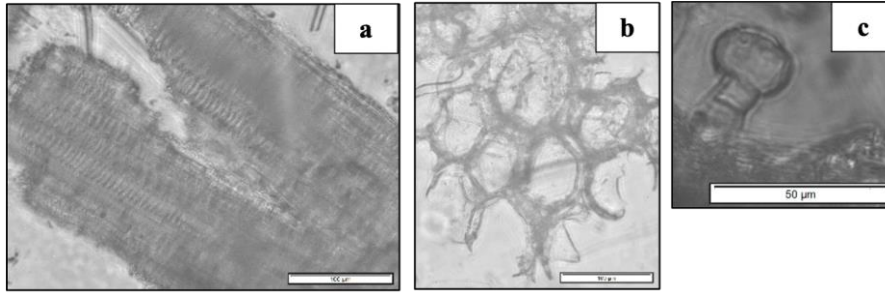
Şekil 8. MV-5 örneğine ait mikromorfolojik bulgular. **a.** Stellat tüy, **b.** peltat tüy, **c.** kapitat tüy



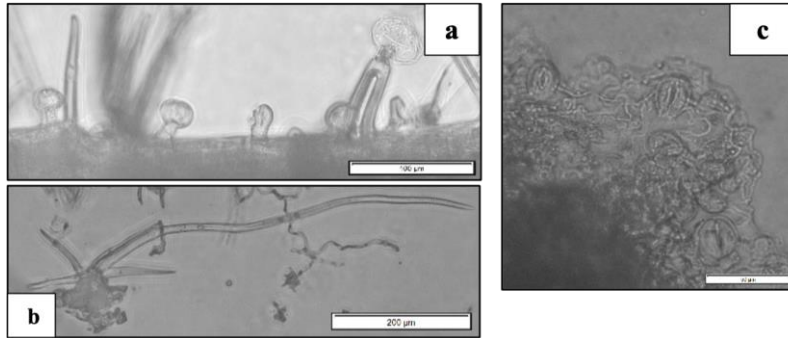
Şekil 9. MV-6 örneğine ait mikromorfolojik bulgular. **a.** Merkez dalı uzamış stellat tüy, **b.** şamdan tüy, **c.** peltat tüy.



Şekil 10. MV-7 örneğine ait mikromorfolojik bulgular. **a.** Kapitat tüy, **b.** iletim demeti



Şekil 11. MV-8 örneğine ait mikromorfolojik bulgular. **a.** İletim demeti, **b.** kollenkima, **c.** kapitat tüy

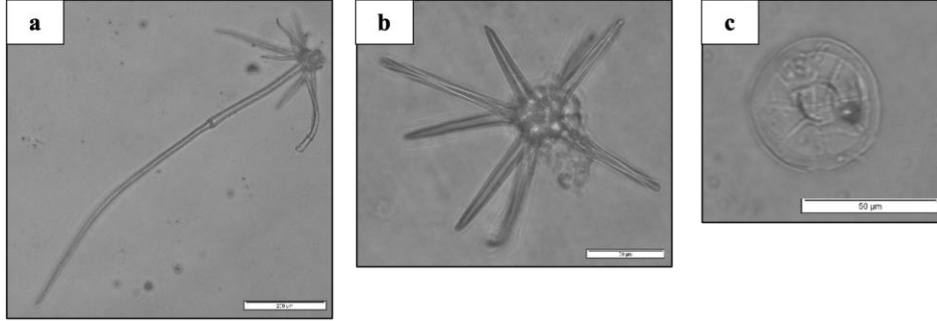


Şekil 12. MV-9 örneğine ait mikromorfolojik bulgular. **a.** Kapitat tüy, **b.** merkez dalı uzamış stellat tüy, **c.** Diasitik tip stoma.

Morfolojik ve mikromorfolojik incelemeler sonucunda, Kütahya'dan toplanan MV-9 örneği hariç, MV örneklerinin A.F. kriterlerine uygun olduğu belirlenmiştir. Öte yandan, *M. vulgare*'nin Türkiye Florası'na göre 10 eşit kaliks dişine sahipken, Avrupa Farmakopesi'ne göre 5 uzun-5 kısa kaliks dişinin bulunması dikkat çekmiştir. Bu durum, *M. vulgare*'nin Türkiye Florası'na göre *M. anisodon* olarak teşhis edilmesine neden olmaktadır.

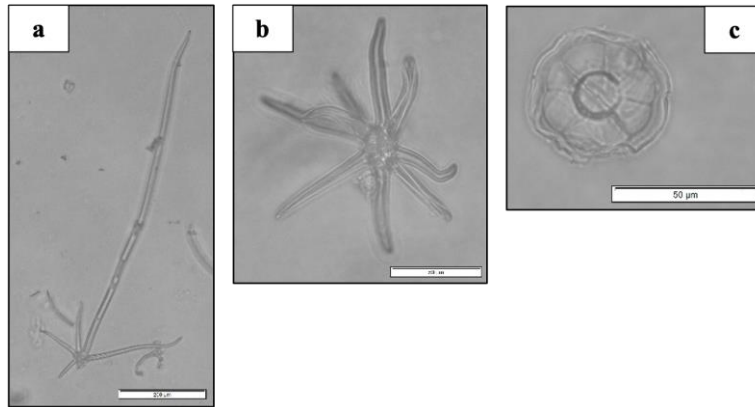
*M. astracanicum*, ülkemizde yayılış gösteren *Marrubium* türleri arasında mor renkli korollaya sahip olan sınırlı sayıda taksonlardandır [9]. Bu tür, kaliks dişlerinin büyüklüklerine göre Türkiye Florası'nda subsp. *astracanicum* ve subsp. *macrodon* olmak üzere iki alttüre ayrılmaktadır. Revizyon çalışmasında ise, iki alttüren farklı türler olarak kabul edilmesi gerektiği beyan edilmektedir. Çalışma kapsamında Kütahya'dan toplanan ve *M. astracanicum* subsp. *astracanicum* olarak teşhis edilen MAS örneği, revizyonda belirtilen koşullara göre *M. astracanicum* türünün mikromorfolojik bulguları ile örtüşmektedir (Şekil 13). İran'da farklı lokalitelerden toplanan *M. astracanicum* örnekleri ile yapılan incelemede, kapitat ve stipitat tüylerin yaprağa kıyasla kalikte daha yoğun olarak gözlemlendiği rapor edilmiştir [22]. Başka bir çalışmada, yine İran'dan toplanan *M. astracanicum* örneklerinin morfolojik

karakterlerinin (kaliks ve korola boyları, kaliks diş sayısı, uzunlukları gibi) MAS ile uyumlu olduğu gözlenmiştir [37]. Bitkinin kaulin yapraklarının diğer taksonlara göre oldukça büyük; stomaların ise oldukça küçük oluşu dikkat çekmiştir.



**Şekil 13.** MAS örneğine ait mikromorfolojik bulgular. **a.** Merkez dalı uzamış yıldızsı tüy, **b.** yıldızsı tüy, **c.** peltat tüy.

*M. peregrinum* (MP) 2'ye dallanan gövde yapısı ve 2 uzun- 3 kısa kaliks dişine sahip olması ile diğer türlerden kolaylıkla ayrılmaktadır (Şekil 2). Bu durum Türkiye Florası'nda "dişlerin belirgin biçimde eşit boyda olmaması" şeklinde belirtilirken, revizyon çalışmasında 2 uzun ve 3 kısa kaliks dişinden bahsedilmiştir. Morfolojik ve mikromorfolojik incelemeler sonucunda, revizyon çalışmasıyla [31] genel olarak benzer sonuçlar elde edilmiştir. Başka bir çalışmada ise, Eskişehir'den toplanan bitkinin yapraklarının her iki yüzeyinde de yoğun olarak örtü ve salgı tüylerinin gözlemlendiği, ayrıca örtü tüylerinin 7-8 sap hücrelerine sahip olduğu bildirilmiştir, bu durum bulgularımızla uyumlu bulunmuştur [40]. Gyuzeleva ve ekibinin raporuna göre ise, bitkinin yapraklarında ağırlıklı olarak diasitik stoma ve yer yer anomositik stoma gözlenmiştir. Çalışmada, bitkinin gövde ve yapraklarında çok hücreli dallanmış örtü tüylerine rastlandığı belirtilmiş, bununla beraber merkez dalın uzamış olduğuna ilişkin bulgu tartışılmamıştır. Ayrıca, yaprakta peltat tüyler ile tek sap ve tek/iki başlı salgı tüylerinin, gövdede ise salgı tüylerinin iki sap ve iki baş hücrelerinden oluştuğu belirtilmiştir [29]. Çalışmamızda ise, yer yer PT'ye rastlanmış ve nadir olarak KT gözlenmiştir. ŞT ve YT'nin diğer türlere göre daha kısa olduğu da dikkat çeken bir diğer husustur (Şekil 14).

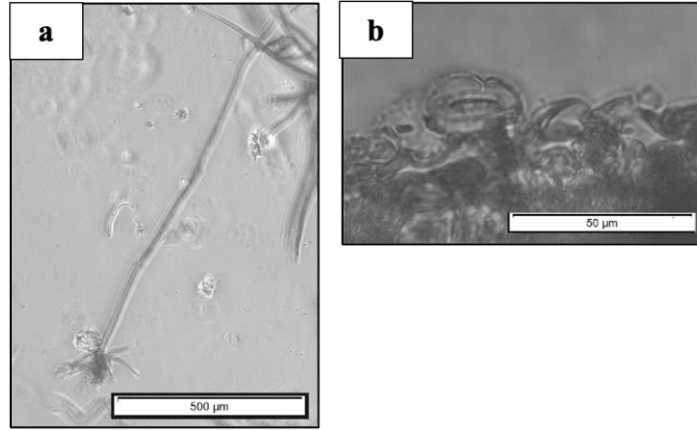


**Şekil 14.** MP örneğine ait mikromorfolojik bulgular. **a.** Merkez dalı uzamış yıldızsı tüy, **b.** yıldızsı tüy, **c.** peltat tüy.

Endemik *M. bourgaei* subsp. *caricum* (MBC) ile yapılan makroskobik incelemeler sırasında, brakteollerin kaliks ile yaklaşık aynı boyda oldukları (Şekil 2) ve yaprak ile gövdede yoğun tüylenme bulunduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu takson kaliks tüylerinin sarı olması ile diğer türlerden kolaylıkla

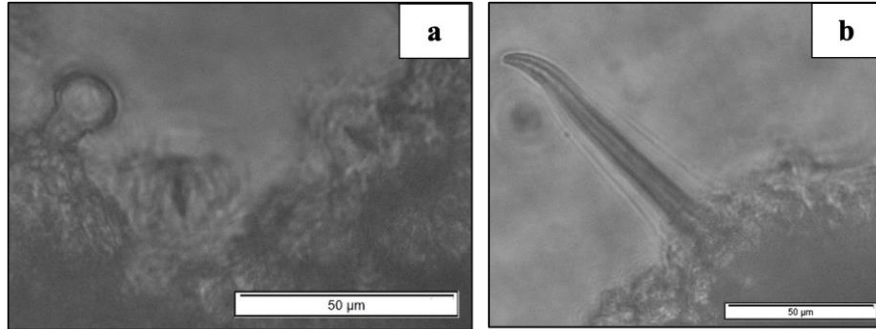


ayrıt edilebilmiş ve bu durumun Türkiye Florası ve revizyon çalışması ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Revizyon çalışmasına göre *M. bourgaei*, Manisa'dan Muğla'ya kadar uzayan *M. rotundifolium* ile karıştırılmaktadır. Rapora göre, iki tür, benzer karakter özellikleri taşımakla beraber, *M. rotundifolium*'un gövdesinde yoğun şekilde dendroid (şamdan) tüy bulunurken, *M. bourgaei*'nin tüyleri yıldızlı şekilde olmalıdır [31]. Bu çalışmada incelenen örnek, revizyondaki MBC taksonunun mikroskobik karakterleri ile uyum göstermektedir (Şekil 15). Büyükkartal ve ekibi *M. bourgaei*'nin yapraklarında anomositik ve amaryllis tip stoma olduğunu, gövdede yoğun şekilde çok hücreli dallanmış tüyler ile salgı tüylerinin bulunduğunu rapor etmişlerdir [25]. MBC örneğinde de yoğun şekilde UT ve yer yer ŞT'ler tespit edilmiş; ancak peltat ve kapitat salgı tüyleri ile stomalara oldukça seyrek rastlanmıştır.

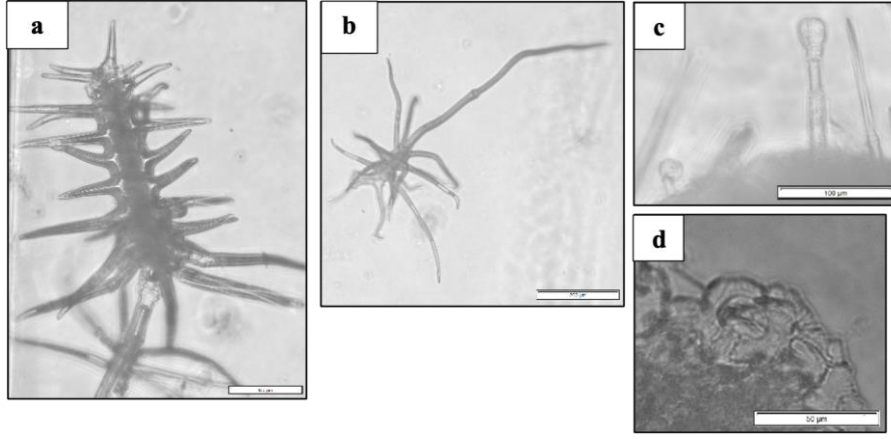


**Şekil 15.** MBC örneğine ait mikromorfolojik bulgular. **a.** Merkez dalı uzamış yıldızlı tüy, **b.** stoma.

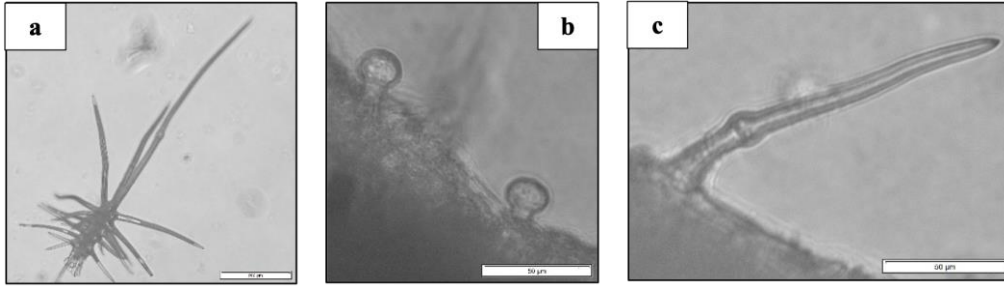
Çalışma kapsamında yapılan makroskobik incelemelerde *M. rotundifolium* (MR) gövde ve yapraklarında MBC'ye benzer şekilde yoğun tüylenme gözlenmiştir. Ayrıca Nif Dağı'ndan toplanan MR-4 örneğinin morfolojik karakterlerinin diğer örneklerden genellikle daha büyük boyutlarda olduğu dikkat çekmiştir. MR-1 ve MR-3 örneklerinin gövde, kaliks ve korolla boyları bakımından, diğer iki örneğe göre daha yakın değerlerde olduğu belirlenmiştir. Benzer durum, örneklerin mikromorfolojik karakterlerinin varlığı ve yoğunluğunda da gözlenmiş, MR-1 ile MR-3'ün; MR-2 ile MR-4'ün birbirine daha yakın olduğu belirlenmiştir (Şekil 16 - Şekil 19). Ayrıca çalışmamızda, MR-3 örneğinde rastladığımız basit örtü tüyünün marrubioid tüy olduğu düşünülmektedir (Şekil 18c). Bununla beraber, revizyon çalışmasında bu türde böyle bir yapı bulunduğu belirtilmemiştir. Marrubioid tüy, basit örtü tüyü tipinde; ancak ondan farklı olarak daha uzun, çok hücreli ve gövde hücrelerinin birleşme yerleri şişkinleşmiş olan ve Türkiye *Marrubium*'larının hemen hemen tamamında görülen bir tüy tipidir [31,41]. Ayrıca bu türde gözlenen polenlerin trikolpat yapıda olduğu bilinmektedir [42].



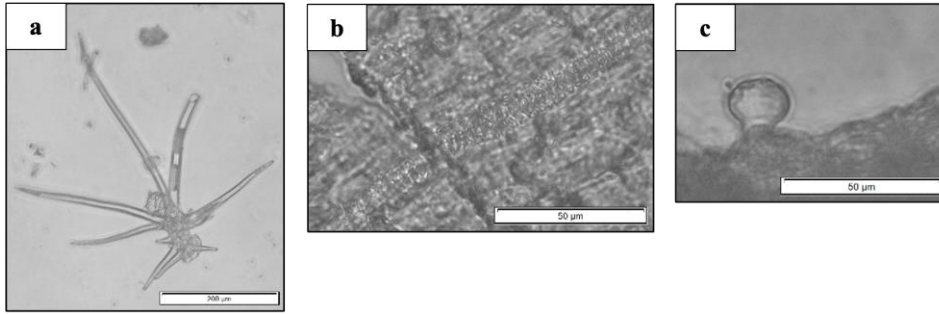
**Şekil 16.** MR-1 örneğine ait mikromorfolojik bulgular. **a.** Kapitat tüy ve stoma, **b.** basit örtü tüyü



Şekil 17. MR-2 örneğine ait mikromorfolojik bulgular. **a.** Şamdan tüy, **b.** merkez dalı uzamış stellat tüy, **c.** kapitat tüyler, **d.** anomositik stoma.



Şekil 18. MR-3 örneğine ait mikromorfolojik bulgular. **a.** Stellat tüy, **b.** kapitat tüyler, **c.** marruboid tüy.



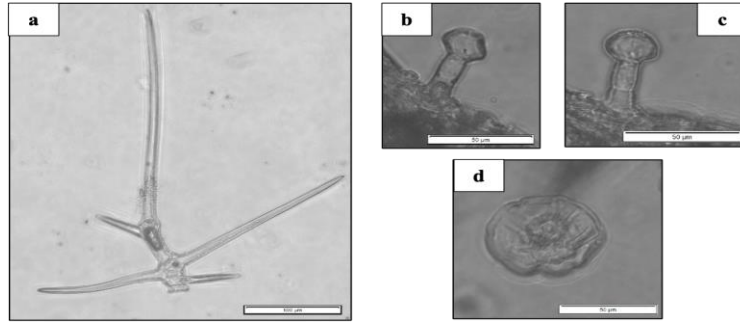
Şekil 19. MR-4 örneğine ait mikromorfolojik bulgular. **a.** Stellat tüy, **b.** iletim demeti, **c.** kapitat tüy.

*M. rotundifolium* ve *M. globosum* subsp. *globosum* (MGG) Türkiye Florası'na göre benzer yayılış alanlarına sahiptir ve kaulin yapraklarının şekil ve büyüklükleri ile kaliks tüpünün boyutlarına göre birbirlerinden ayrılmaktadır. Çalışma kapsamında Muğla Yılanlı Dağ'dan toplanan örnek, *M. globosum* subsp. *globosum* olarak teşhis edilmiştir. Ancak revizyon çalışmasında, buradan toplanan örneklerin aslında *M. rotundifolium* olduğu ve Flora'daki tip örneğinin tek lokaliteden toplanan örneklerle göre betimlenmesinden dolayı *M. rotundifolium* örneklerinin yanlış teşhis edildiği belirtilmiştir [31]. Yazara göre, *M. rotundifolium* örnekleri 30-40 cm değil, 20-40 cm boylarında, yaprakları 20-30x25-35 mm ebatlarında, tüyler piloz değil, şamdan (dendroid) pubescent ve lanat tüy taşımaktadır [31]. Nif Dağı ve Bozdağ'dan topladığımız MR örnekleri ise, yazarın *M. rotundifolium* için belirttiği lokalitelerde yayılış göstermekle birlikte, gövde boyları belirtilen gövde boylarından çok daha uzundur (30-65 cm). Mikromorfolojik incelemeler sırasında oldukça yoğun olarak rastlanan şamdan (dendroid) tüyün, *M.*



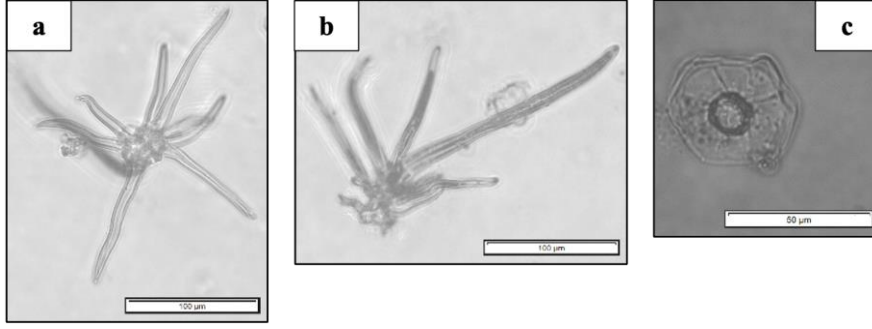
*rotundifolium* için tipik ve hatta türün bu karakteri ile kendisine yakın olan *M. globosum* subsp. *globosum*'dan ayrıldığı revizyonda açıkça beyan edilmiştir. Bununla beraber, çalışmamızda MGG örneğinde de yoğun şekilde dendroid (şamdan) tüye rastlanmıştır.

MGG ile gerçekleştirilen morfolojik incelemeler, bu taksonun makroskobik yapılarının (yaprak büyüklüğü, korolla ve kaliks boyu gibi) diğer pek çok türden daha küçük olduğunu göstermiştir. Mikromorfolojik incelemelerde ise, örneğin yoğun şekilde piloz, yıldız, şamdan ve salgı tüyü taşıdığı gözlenmiştir (Şekil 20). Çalışmanın sonuçları ile uyumlu olarak, başka bir çalışmada, Samsun'dan toplanan bitkinin gövde epidermasında oldukça yoğun salgı tüyü ve yoğun basit tüye rastlanırken; yaprak üst yüzeyinde sık örtü tüyü ile az sıklıkta salgı tüyleri ve alt epidermiste ise çok hücreli salgı ve örtü tüyleri olduğu rapor edilmiştir [23]. Diğer yandan, revizyon çalışmasına göre, *M. globosum* türü temel olarak gövdelerinin kavisli yay şeklinde yükselici olması ve brakteollerinin genellikle kaliks tüpünden kısa olması ile *M. rotundifolium*'dan ayrılmaktadır. Yazar bu türü 3 alttüre ayırmış, bunlardan bir tanesi olan subsp. *globosum*'un 10-20 cm gövde boyuna sahip olduğunu belirtmiştir [31]. Çalışmamızda ise MGG örnekleri 40-45 cm boylarındadır. Ayrıca daha önce Sarıkürkçü ve ekibinin aynı lokaliteden topladığı örnek de *M. globosum* subsp. *globosum* olarak tayin edilmiştir [43]. Bitkinin morfolojik karakterlerinin incelendiği diğer bir çalışmada ise bitkinin tohum kabuğunun yapısı ortaya konulmuştur [44].

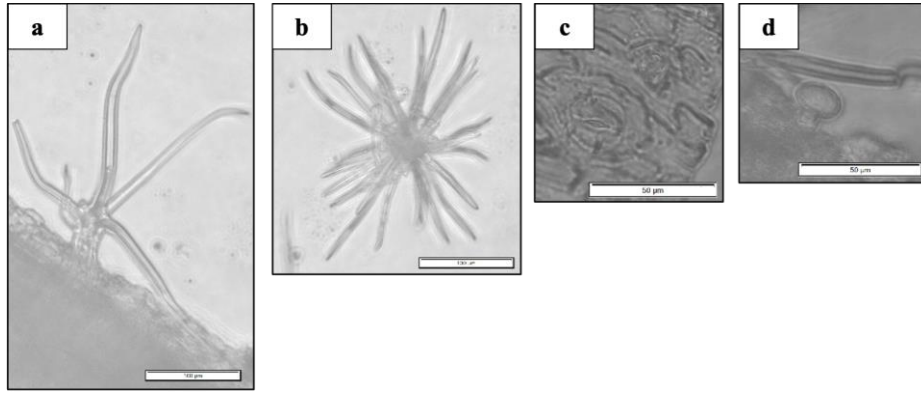


**Şekil 20.** MGG örneğine ait mikromorfolojik bulgular. **a.** Şamdan tüy, **b** ve **c.** tek ve çok sap hücreli kapitat tüyleri, **d.** peltat tüy.

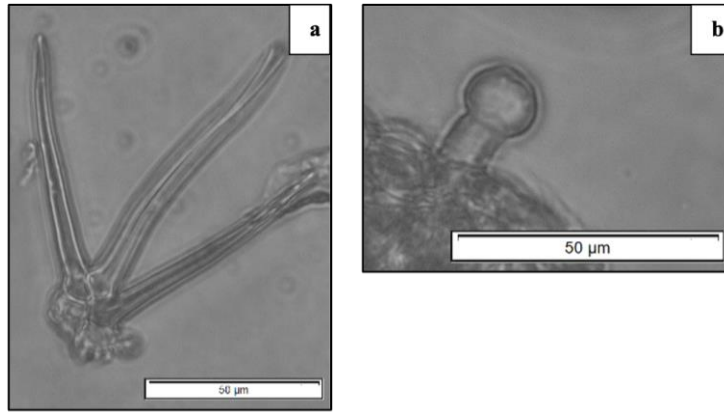
İncelenen örnekler arasında, *M. parviflorum* subsp. *parviflorum* (MPP) ve *M. parviflorum* subsp. *oligodon* (MPO) teşhisi zor olan diğer taksonlardır. Türkiye Florası tayin anahtarına göre, *M. parviflorum* subsp. *oligodon*'un kaliksleri 5-8 dişli ve dişler farklı boyda iken; Flora ile uyumlu şekilde, MPO'da 5 uzun diş ve bazen 2-3 kısa diş bulunmaktadır (Şekil 2). Ancak *M. parviflorum* subsp. *parviflorum* Flora'da "10-15 dişli ve dişler eşit boya sahip" şeklinde tanımlanırken, MPP örneklerinde 5 uzun ve 4-5 kısa diş gözlenmiştir. Yani Türkiye Florası'nda belirtilenin aksine, MPP ve MPO taksonlarının diş sayılarının 5-8 veya 10-15 gibi birbirinden uzak sayıda olmadığı, ayrıca kaliks dişlerinin boylarındaki farklılıklara göre ayrılmadıkları gözlenmiş, durum revizyon çalışması ile doğrulanmıştır. Mikromorfolojik incelemeler sırasında ise, MPP-1'de PT yaygın olarak bulunurken; MPP-2'de PT'ye neredeyse hiç rastlanmamış ve stomalar seyrek olarak gözlenmiştir. Her iki örnekte de uzun tüy, stellat tüy ve şamdan tüy yoğun olarak bulunmaktadır. MPO ise MPP'ye göre daha az gelişmiş olmasına (gövde boyu, kaulin yaprak ölçüleri) rağmen, kaliks boyu ve diş uzunluğu bakımından daha büyük boyutlardadır. Örnekte PT ve stomalara seyrek olarak rastlanırken, şamdan tüyden ziyade stellat tüy gözlenmiştir (Şekil 21-Şekil 23). Başka bir çalışmada ise, Karaman'dan toplanan MPO örneğinin gövde epidermasında değişen sayıda sap hücrelerine sahip salgı tüylerinin ve dallanmış örtü tüylerinin çok yoğun olarak bulunduğu rapor edilmiştir [40]. İran'dan toplanan *M. parviflorum* örneklerinde gözlenen stellat tüylerin çok sıralı kısa dallardan oluştuğunun bildirilmesi, bu çalışmada edinilen bulguları doğrulamaktadır [22].



Şekil 21. MPO örneğine ait mikromorfolojik bulgular. **a.** Stellat tüy, **b.** şamdan tüy, **c.** peltat tüy.



Şekil 22. MPP-1 örneğine ait mikromorfolojik bulgular. **a.** Şamdan tüy, **b.** stellat tüy, **c.** anomositik stoma, **d.** kapitat tüy.



Şekil 23. MPP-2 örneğine ait mikromorfolojik bulgular. **a.** Stellat tüy, **b.** kapitat tüy

Dikkat çeken diğer bir husus ise; kaliks yapıları (dişlerin sayısı ve boyları) yönünden benzer olan ve hem Türkiye Florası'nda hem de Türkiye Bitkileri Listesi'nde [5] "alttür" olarak geçen bu taksonların, tarafımızca aynı köyden toplanmış olmalarıdır. Bu durum MPO ile MPP'nin alttürden ziyade "varyete" olabileceklerini düşündürmektedir. Benzer şekilde revizyon çalışmasında da bu alttürlerin birlikte yayılış gösterdiği, kaliks diş sayılarında varyasyon gözlemlendiği ve taksonların "varyete" düzeyinde temsil edilmesinin daha uygun olacağı rapor edilmiştir. Ayrıca önceki çalışmada, yurt dışındaki herbaryumlardan gelen örneklerin *M. parviflorum* subsp. *oligodon* olduğu ve bu alttürün Türkiye için endemik olmadığı beyan edilmiştir [31]. Türkiye Bitkileri Listesi'nde ise bu takson Asıl Ege endemiği olarak yer almaktadır [5].

Aynı taksona ait farklı populasyonların (örn. MR, MPP ve MV örnekleri) anatomik ve morfolojik yapıları ile kimyasal içerikleri, çevresel koşullara bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Ahvazi ve ekibi, farklı lokalitelerden toplanan *M. vulgare* örneklerindeki stellat tüylerde merkezdeki uzamış dalların sayısının ve uzunluğunun, bitkinin toplandığı yükselti ile ters korelasyon gösterdiğini bildirmiştir [22]. Akgül ve ekibi, çoğu *Marrubium* taksonuna ait polenin trikolpat yapıda olduğunu gözlemlemiş [45,46], Lawrence ise, trikolpat polene sahip Lamiaceae üyelerinin uçucu yağ bakımından fakir olduklarını ve seskiterpen yapıdaki bileşiklerin major olarak bulunduğunu rapor etmiştir [47]. Bu durum ekibimiz tarafından gerçekleştirilen önceki çalışmada da gözlenmiş, iki farklı lokaliteden toplanan *M. rotundifolium* örneklerinin minör bileşikleri arasında ciddi farklılıklar tespit edilmiştir [48]. Önceki bulgulardan hareketle, bu çalışmada, farklı *Marrubium* taksonlarına ait örneklerin morfolojik ve mikromorfolojik yönden karşılaştırılması ve taksonomik olarak gözlenen bazı karışıklıklara açıklık getirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmada tür teşhisleri “Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası” tayin anahtarı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve yukarıda belirtilen revizyon çalışması ile tayin anahtarı arasında taksonomik bakımdan farklılıklar bulunan taksonlarda (*M. parviflorum* alttürleri, *M. bourgaei* subsp. *caricum*, *M. rotundifolium* ve *M. globosum* subsp. *globosum*) Türkiye Bitkileri Listesi: Damarlı Bitkiler kaynağındaki bilgiler (taksonomik ve endemizm durumları gibi) esas alınmıştır [5].

Bu çalışma ile başta endemik türler olmak üzere, Türkiye *Marrubium*'larının yaklaşık 1/3'ünün mikromorfolojik ve morfolojik yapıları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. *Marrubium parviflorum*'un iki alttürü (subsp. *parviflorum* ve subsp. *oligodon*) ve endemik taksonlar *M. rotundifolium*, *M. globosum* subsp. *globosum* ve *M. bourgaei* subsp. *caricum*'un Türkiye Florası tayin anahtarına göre teşhislerinde ve taksonomilerinde karışıklıklar olduğu belirlenmiştir. Bu durumun bitkinin yetiştiği ortam koşullarından kaynaklanabileceği gibi, cinsin belki de henüz evrimini tamamlamamış olmasından da ileri gelebileceği düşünülmektedir. Buna bağlı olarak türler/taksonlar arası ilişkilerin aydınlatılabilmesi için genetik taksonomiden faydalanılması önerilmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bitkilerin lokalite bilgilerinin sunulduğu harita (Şekil 1) Dr. Fulya Aydın Kandemir tarafından oluşturulmuştur.

## YAZAR KATKILARI

Kavram: T.D.A., S.B.; Tasarım: T.D.A., S.B.; Denetim: S.B.; Kaynaklar: S.B.; Malzemeler: T.D.A., S.B.; Veri Toplama ve/veya İşleme: T.D.A.; Analiz ve/veya Yorumlama: T.D.A., S.B.; Literatür Taraması: T.D.A.; Makalenin Yazılması: T.D.A.; Kritik İnceleme: T.D.A., S.B.; Diğer: T.D.A., S.B.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

## ETİK KURUL ONAYI

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

## KAYNAKLAR

1. Lamiaceae. (2013). The Plant List. From <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Lamiaceae/> Erişim tarihi: 04.09.2022
2. Kuşaksız, G. (2019). Rare and Endemic Taxa of Lamiaceae in Turkey and Their Threat Categories. *Journal of Scientific Perspectives*, 3(1), 69-84. [CrossRef]
3. Celep, F., Dirmenci, T. (2017). Systematic and Biogeographic overview of Lamiaceae in Turkey. *Natural Volatiles & Essential Oils*, 4(4), 14-27.
4. *Marrubium* L. (2013). The Plant List. From: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Lamiaceae/Marrubium/> Erişim tarihi: 04.09.2022
5. Dirmenci, T. (2012). *Marrubium* L. In: A. Güner, S. Aslan, T. Ekim, M. Vural, M.T. Babaç (Eds.), Türkiye

- Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler) (p. 559–561). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını.
6. Firat, M. (2016). *Marrubium eriocephalum* (Lamiaceae); A species new to the flora of Turkey, with contributions to its taxonomy. *PhytoKeys*, 58(1), 9-20. [\[CrossRef\]](#)
  7. Özhatay, N., Kültür, Ş., Gürdal, B. (2019). Check-list of additional taxa to the supplement flora of Turkey VII. *Istanbul Journal of Pharmacy*, 49(2), 105-120. [\[CrossRef\]](#)
  8. Özhatay, N., Kültür, Ş., Gürdal, B. (2017). Check-list of additional Taxa to the supplement flora of Turkey VII. *Istanbul Journal of Pharmacy*, 47(1), 30-44. [\[CrossRef\]](#)
  9. Cullen, J. (1972). *Marrubium* L. In: P.H. Davis (Ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. vol. VII (pp. 165-178). Edinburgh University Press.
  10. Yabrir, B., Touati, M., Adli, B., Bezini, E., Ghafoul, M., Khalifa, S., Guit, B. (2018). Therapeutic use of spontaneous medicinal flora from an extreme environment (dune cordon) in Djelfa Region, Algeria. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 6(5), 358-373.
  11. Yousefi, K., Hamedeyazdan, S., Torbati, M., Fathiazad, F. (2016). Chromatographic fingerprint analysis of marrubiin in *Marrubium vulgare* L. via HPTLC technique. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 6(1), 131-136. [\[CrossRef\]](#)
  12. Motti, R., Bonanomi, G., Emrick, S., Lanzotti, V. (2019). Traditional herbal remedies used in women's health care in Italy: A review. *Human Ecology*, 47(6), 941-972. [\[CrossRef\]](#)
  13. Tuzlacı, E. (2006). Şifa Niyetine: Türkiye'nin Bitkisel Halk İlaçları (1. Baskı). Alfa Yayınları
  14. Tuzlacı, E. (2016). Türkiye'nin Geleneksel İlaç Bitkileri (1. Baskı). İstanbul Tıp Kitabevleri.
  15. Sargin, S.A., Selvi, S., López, V. (2015). Ethnomedicinal plants of Sarigöl district (Manisa), Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 171, 64-84. [\[CrossRef\]](#)
  16. Selvi, S., Polat, R., Çakılcıoğlu, U., Celep, F., Dirmenci, T., Ertuğ, Z.F. (2022). An ethnobotanical review on medicinal plants of the Lamiaceae family in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 46, 283-332. [\[CrossRef\]](#)
  17. De Vos, P. (2010). European materia medica in historical texts: Longevity of a tradition and implications for future use. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1), 28-47. [\[CrossRef\]](#)
  18. HPMC. (2013). Assessment report on *Marrubium vulgare* L., herba (p. 1-27). European Medicines Agency.
  19. German Commission E. (2018). Horehound herb. *Herbal Medicine: Expanded Comission E*. <https://www.herbalgram.org/resources/commission-e-monographs/approved-herbs/horehound-herb/>
  20. Farmakope Komisyonu. (2016). Bozotu: Marrubii Herba. In: *Türk Farmakopesi II (Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu)* (p. 398-400). T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu
  21. Öztürk, B., Demiröz, T., Özdemir, S., Karaalp, C. (2018). The Place and Importance of Medicinal Plants of Turkey in Pharmacopoeias and Herbal Monographs. *Türk Farmakope Dergisi*, 3(2), 10-30.
  22. Ahvazi, M., Jamzad, Z., Balali, G.R., Saeidi, H. (2016). Trichome micro-morphology in *Marrubium* L. (Lamiaceae) in Iran and the role of environmental factors on their variation. *Iranian Journal of Botany*, 22(1), 39-58. [\[CrossRef\]](#)
  23. Camili, B., Akçin Aktaş, T. (2016). Bazı endemik *Marrubium* L. (Lamiaceae) taksonları üzerinde morfolojik, mikromorfolojik ve anatomik bir araştırma. *Biyoloji Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Üniversitesi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, Türkiye*
  24. Yalçın, H., Akgül, G. (2012). *Marrubium depauperatum* Boiss. et Ball., *Marrubium parviflorum* Fish. et Mey. ssp. oligodon (Boiss.) Seybold ve *Marrubium x anatolicum* Akgül & Dadandı (Lamiaceae) türlerinin morfolojik özellikleri ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi. *Biyoloji Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nevşehir Üniversitesi, Nevşehir, Türkiye*.
  25. Büyükkartal, H.N., Çölgeçen, H., Akgül, G. (2016). Comparative leaf, stem and root anatomies of taxa *Marrubium bourgaei* and *Marrubium heterodon* (Lamiaceae). *Australian Journal of Crop Science*, 10(11), 1516-1522. [\[CrossRef\]](#)
  26. Aytaş Akçin, T., Camili, B. (2018). Micromorphological and anatomical characters of the Turkish endemic *Marrubium trachyticum* Boiss. (Lamiaceae). *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 19(1), 77-83. [\[CrossRef\]](#)
  27. Tuylu, M., Büyükkartal, H.N., Akgül, G., Kalyoncu, H. (2016). *Marrubium lutescens* Boiss. ve *M. cephalanthum* Boiss. & Noë subsp. *akdaghicum* (Lamiaceae)' un Gövde ve Yaprak Özelliklerinin Anatomik Olarak Karşılaştırılması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 21(1), 113. [\[CrossRef\]](#)
  28. Çalı, İ. Ö. (2017). Glandular trichomes in *Marrubium cephalanthum* ssp. *montanum* (Lamiaceae) growing in Turkey. *International Journal of Agriculture and Biology*, 19(4), 697-700. [\[CrossRef\]](#)
  29. Gyuzeleva, D. P., Stoyanov, P. S., Bivolarska, A. V., Mladenov, R. D., Mladenova, T. R., Petkov, V. H., Todorov, K. T. (2022). Anatomical Investigation of *Marrubium friwaldskyanum* Boiss. and *Marrubium peregrinum* L. (Lamiaceae) from Bulgaria. *Ecologica Balkanica*, 14(1), 87-101.

30. Zheljzkov, V.D., Semerdjieva, I.B., Stevens, J.F., Wu, W., Cantrell, C.L., Yankova-Tsvetkova, E., Koleva-Valkova, L.H., Stoyanova, A., Astatkie, T. (2022). Phytochemical investigation and reproductive capacity of the Bulgarian endemic plant species *Marrubium friwaldskyanum* Boiss. (Lamiaceae). *Plants*, 11(1), 1-22. [CrossRef]
31. Akgül, G., Ketenoğlu, O. (2004). *Marrubium* L. (Lamiaceae) Cinsinin Revizyonu. Ankara University.
32. Türkiye haritası. <http://www.turkiyeharitasi.gen.tr/2018/10/10/turkiye-fiziki-haritasi/> Erişim tarihi: 3.10.2022
33. Esri. (2022). ArcGIS Pro 2.18. <https://www.esri.com/en-us/arcgis/products/arcgis-pro/> Erişim tarihi: 2.07.2022
34. European Pharmacopoeia Commission. (2016). White Horehound/Marrubii herba. In European Pharmacopoeia 9.6 (p. 6001-6002). Council of Europe.
35. Metcalfe, C.R., Chalk, L. (1965). Labiatae. In *Anatomy of the Dicotyledons* (p. 1043–1052). Oxford University Press, Oxford, İngiltere.
36. Aytaş Akçin, T., Camili, B. (2018). Micromorphological and Anatomical Characters of The Turkish Endemic *Marrubium trachyticum* Boiss. (Lamiaceae). *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 19(1), 77-83. [CrossRef]
37. Kharazian, N., Hashemi, M. (2017). Chemotaxonomy and morphological studies in five *Marrubium* L. species in Iran. *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science*, 41(1), 17-31. [CrossRef]
38. Talebi, S.M., Sheidai, M., Ariyanejad, F., Matsyura, A. (2019). Stem anatomical study of some Iranian *Marrubium* L. species. *Biodiversitas*, 20(9), 2589-2595. [CrossRef]
39. Koç, S.S., Demirci, F. (2019). *Marrubium vulgare* L.'nin farmakognozik incelemesi. *Farmakognozi Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Anadolu Üniversitesi, Ankara, Türkiye*.
40. Tuylu, M., Kalyoncu, H., Büyükkartal, H. N. (2015). Bazı *Marrubium* L. (Lamiaceae) taksonlarının yaprak ve gövde anatomisi, histolojisi, sitolojisi. *Biyoloji Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, Türkiye*.
41. Mannethody, S., Sunojkumar, P. (2018). Trichome micromorphology and its systematic significance in Asian Leucas (Lamiaceae). *Flora*, 242(November 2016), 70-78. [CrossRef]
42. Akgül, G., Ketenoğlu, O., Pinar, N. M., Kurt, L. (2008). Pollen and seed morphology of the genus *Marrubium* (Lamiaceae) in Turkey. *Annales Botanici Fennici*, 45(1), 1-10. [CrossRef]
43. Sarikurcu, C., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Harmandar, M. (2008). Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *globosum* (Lamiaceae) by three different chemical assays. *Bioresource Technology*, 99(10), 4239-4246. [CrossRef]
44. Büyükkartal, H.N., Çölgeçen, H., Akgül, G. (2009). *Marrubium globosum* Montbret & Aucher ex Benth.' de tohum kabuğunun yapısı. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 10(1), 223-227
45. Akgül, G., Ketenoğlu, O., Pinar, N.M., Kurt, L. (2008). Pollen and seed morphology of the genus *Marrubium* (Lamiaceae) in Turkey. *Annales Botanici Fennici*, 45(1), 1-10. [CrossRef]
46. Kılıçkaya, N., Akgül, G. (2017). Edinburgh (İngiltere) Herbaryumu'nda Bulunan *Marrubium* L. (Lamiaceae) Cinsine Ait Bazı Türlerin Polen Morfolojisi. *Biyoloji Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi*.
47. Lawrence, B. M. (1992). Economic aspects of the Labiatae. In R. M. Harley & T. Reynolds (Eds.), *Advances in Labiatae Science* (p. 399-435). Royal Botanic Gardens.
48. Demiröz Akbulut, T., Demirci, B., Baykan, S. (2020). Essential oils of *Marrubium* L. taxa from Aegian province of Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 32(6), 485-493. [CrossRef]





## MESLEKLER ARASI EĞİTİME GENÇ BAKIŞ: SIMÜLASYON UYGULAMASINA YÖNELİK ÖĞRENCİ GÖRÜŞLERİ

*A YOUTH VIEW ON INTERPROFESSIONAL EDUCATION: STUDENT OPINIONS ON  
SIMULATION PRACTICES*

**Bilge SÖZEN ŞAHNE<sup>1\*</sup>** , **Elif ULUTAŞ DENİZ<sup>2</sup>** , **Leyla YUMRUKAYA<sup>1</sup>** ,  
**Melih ELÇİN<sup>3</sup>** , **Selen YEĞENOĞLU<sup>1</sup>** 

<sup>1</sup>Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eczacılık İşletmeciliği Anabilim Dalı, 06100, Ankara

<sup>2</sup>Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eczacılık İşletmeciliği Anabilim Dalı, 25240, Erzurum

<sup>3</sup>Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıp Eğitimi ve Bilişimi Anabilim Dalı, 06100, Ankara

### ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmada, eczacılık ve eczane teknikerliği öğrencilerinin meslekler arası simülasyon uygulaması ile bir araya getirilerek birbirlerini tanımaları ve bu uygulamaya ilişkin ilgili görüşlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışma kapsamında, 27 eczacılık ve 51 eczane teknikerliği öğrencisinin katıldığı standart hasta görüşmeleri gerçekleştirilmiştir. Görüşme sonrasında öğrencilerin yazılı geri bildirimleri alınarak nitel bulgular betimsel analiz aşamalarına uygun bir şekilde, MaxQDA v11 ile analiz edilmiştir.

**Sonuç ve Tartışma:** Bu bulgular doğrultusunda “Eczane içi etkileşim”, “Görev paylaşımı”, “Eğitim çıktıları” ve “Fiziksel imkanlar” temaları ortaya çıkmıştır. Eczacılık alanındaki benzer çalışmalarla örtüşen bulguların elde edildiği bu çalışmada, öğrencilerin değerlendirmelerinin, mezuniyet sonrasındaki teknikerler ile olan iş birliğinin temellerinin atılması açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, çalışmamızın elde edilen sonuçları ışığında, eğitim programında yapılan güncellemelerin mesleki uygulamalara olumlu katkıları olacağına inanılmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Eczacılık, meslekler arası eğitim, meslekler arası iş birliği, simülasyon, teknik olmayan beceriler

\* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Bilge Sözen Şahne  
e-posta / e-mail: bilgesozen@yahoo.com, Tel. / Phone: +903123054226

Gönderilme / Submitted : 26.08.2022

Kabul / Accepted : 21.10.2022

Yayınlanma / Published : 20.01.2023

## ABSTRACT

**Objective:** *In this study, we aimed to bring together the pharmacy and pharmacy technician students via interprofessional simulation practices, to know each other and to discover their opinions about this practice.*

**Material and Method:** *Standardized patient encounters were conducted by the participation of 27 pharmacy and 51 pharmacy technician students within this study. Thereafter, the written feedback of the students was obtained, and the qualitative findings were analysed with MaxQDA v11.*

**Result and Discussion:** *As a result, four main themes entitled as "Interaction in the pharmacy", "Task sharing", "Educational outputs" and "Physical facilities" emerged. In this research study, which has overlapping findings with similar studies in pharmacy field, we determined that the evaluations of the students are important for establishing strong basis on interprofessional collaboration. However, we believe that updating the undergraduate curriculum in the light of our study results will affect future professional practices in a positive manner.*

**Keywords:** *Interprofessional collaboration, interprofessional education, pharmacy, simulation, soft skills*

## GİRİŞ

Tıbbi hataların önlenerek, hasta güvenliğinin sağlanmasında, sağlık çalışanları arasında iletişimin ve iş birliğinin sağlanmasının gerekliliği, çeşitli çalışmalarla ortaya konmaktadır [1,2]. Bu iş birliği için de meslekler arası etkileşim ve iletişimin güçlendirilmesine olanak sağlayan eğitim süreçlerine ihtiyaç duyulmaktadır [3]. Tıbbi hatalar arasında yer alan ve büyük ölçüde önlenebilir olan ilaç hatalarının giderilmesindeyse, eczacılık hizmetinin sunumunda birlikte görev alan sağlık ekibi üyeleri; eczacılara ve eczane teknikerlerine önemli görevler düşmektedir [4].

Sağlık hizmetinin önemli bileşenlerinden olan eczacılık hizmeti sunumunda bir arada çalışan eczacı ve eczane teknikerleri, çalışma alanları nedeniyle pek çok sorumluluk üstlenmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), 1997 yılında yayınladığı raporunda, eczacıların sahip olması gereken bakım verici, iletişimci, yaşam boyu öğrenen gibi özellikleri "7 Yıldızlı Eczacı" olarak tanımlamıştır [5]. Bununla birlikte, son yıllarda araştırmacı ve girişimci olmak üzere iki yetkinlik daha eklenerek, "9 Yıldızlı Eczacı" kavramı da ortaya çıkmıştır [6]. Eczane teknikerleri ise ülkemizde eczane hizmetleri ön lisans programından mezun olan kişiler olarak tanımlanarak, eczacının gözetimi ve denetiminde eczacılıkla ilgili yardımcı sağlık personeli olarak görev almaktadır [7].

Sağlık hizmetleri sunumunda iş birliği; ilaç yan etkilerinin azaltılması, ilaç kullanımının en uygun dozda yapılabilmesinin sağlanması, mortalite ve morbidite oranlarının düşürülmesi gibi sağlık hizmeti çıktıları yönünden kritik önem taşımaktadır. Ayrıca, bu iş birliğinin, sağlık çalışanları açısından da iş tatmininin artması ve iş yükünün azalması gibi olumlu etkileri bulunmaktadır [8]. Bununla birlikte, meslekler arası iş birliğini sağlayabilmek adına, lisans eğitiminin büyük önem taşıdığı belirtilmekte ve lisans dönemindeki iş birliğine yönelik eğitim faaliyetlerinin, öğrencilerin mesleki yaşamlarında, multidisipliner ekiplerde çalışabilecek birer takım arkadaşı olmalarını kolaylaştırdığı ifade edilmektedir [9]. İşbirliğine dayalı ekip üyeliğinin gerçekleştirilebilmesi için de meslekler arası eğitim faaliyetlerinin yürütülmesi gerekmektedir. Söz konusu eğitim süreçlerinde, birden fazla meslek grubunun, birlikte ve birbirleriyle etkileşim kurarak çalışmalarını desteklemeleri önem taşımaktadır [10].

Eczacılık alanında, öğrencilerin edindikleri bilgileri ve yetkinlikleri gerçek zamanlı olarak kullanabilmelerini sağlamak amacıyla, iletişim becerilerinin geliştirilmesine yönelik ders içeriklerinin bulunmasının kritik önem taşıdığı belirtilmektedir [11]. Hasta odaklı yaklaşımın getirdiği yeniliklerle birlikte, eczacılık eğitimi süresince simülasyon uygulamalarının yapılmasının önemli olduğu görülmektedir [12]. Eczacılık eğitiminde simülasyon tabanlı eğitim yöntemleri çoğunlukla iletişim, meslekler arası çalışma ve klinik becerileri geliştirmek amacıyla kullanılmaktadır [13].

Meslekler arası öğrenme, farklı meslek alanlarından öğrencilerin birbirlerinin görev ve sorumluluklarını anlama ve öğrenmesi ile ilişkilendirilen bir eğitim stratejisidir. Bu öğrenme yönteminin en iyi yolunun ise sürecin birlikte deneyimlenmesi olduğu belirtilmektedir [14]. Bu kapsamda, eğitimde simülasyon uygulamaları ile öğrencilerin meslek hayatlarında karşılaşılabilecekleri bir durumu deneyimlemeleri sağlanmaktadır [15].

Mesleki eğitim süreçlerinde farklı meslek gruplarının bir araya gelmesiyle, meslekler arası iş birliğinin daha kolay sağlanabileceği, yapılan çalışmalarla ortaya konan bir durumdur [3,16,17]. Meslekler arası eğitimin, özellikle hasta odaklı yaklaşımın benimsenmesi, ekip çalışması ve profesyonel rollerin anlaşılabilmesini sağladığı bilinmektedir [18]. Ayrıca, standart hasta görüşmelerinin ve diğer simülasyon uygulamalarının, meslekler arası eğitim için uygun olduğu belirtilmektedir [19,20]. Eczacılık eğitiminde ve meslekler arası eğitimde simülasyon uygulamalarının olumlu etkisi, çeşitli çalışmalarda incelenen bir konudur [21-23]. Bu bakımdan eczane ortamında birlikte çalışabilen eczacılar ve eczane teknikerlerinin, beraber çalışma becerilerinin, lisans ve ön lisans eğitimleri sırasında geliştirilmesi, meslek hayatları ve sağlık hizmetinin kalitesi açısından kritik önem taşımaktadır.

Ancak, ülkemizde eczacılık alanında bu yönde yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma kapsamında, standart hastaların yer aldığı simülasyon uygulamasında, eczacılık ve eczane hizmetleri programı öğrencilerinin bir araya getirilmesi; uygulama sonrasında öğrencilerin meslekler arası iş birliği ve simülasyon uygulamasına yönelik görüşlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, “Eczacılık Fakültesi ve Eczane Hizmetleri Programı öğrencilerinin, simülasyon ortamında bir araya gelme ile ilgili görüşleri nelerdir?” araştırma sorusu ışığında öğrencilerin konu hakkındaki görüşlerinin ortaya konması için, nitel araştırma desenlerinden, durum çalışması olarak tasarlanmıştır. Etik kurul onayının ardından, iletişim becerilerine yönelik gerçekleştirilen standart hastaların yer aldığı simülasyon uygulaması sonrasında, öğrencilerin uygulamaya yönelik geri bildirimleri alınmıştır.

### Katılımcılar

Eczacılık Fakültesi ve Eczane Hizmetleri Programı’nda, iletişim becerileri ile ilgili konuların aktarıldığı dersleri alan öğrencilere, uygulama hakkında kısaca bilginin verilerek, gönüllü katılım çağrısı yapılmıştır. Eczacılık Fakültesinde “Eczane İşletmeciliği” dersini alan 28 öğrenciden 27’si ve Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Eczane Hizmetleri Programı’nda “Eczane Hizmetleri İlkeleri ve Etik Kurallar” dersini alan 68 öğrenciden 51’i, gönüllülük esasına uygun biçimde uygulamaya katılmıştır.

### Uygulama ortamı

Simülasyon uygulamasında gönüllü öğrenciler, üniversitenin “Meslekler Arası Eğitim ve Simülasyon Merkezi”nde bulunan, eczane simülasyon laboratuvarında (Şekil 1 ve Şekil 2) bir araya getirilmiştir.



Şekil 1. Eczane simülasyon laboratuvarının önden görünüşü





Şekil 2. Eczane simülasyon laboratuvarını yukarıdan görünüş

### Uygulama

Standart hasta görüşmesi öncesinde öğrencilere; iletişim, etik, simülasyon yöntemi ve meslekler arası eğitim konularında temel bilgiler verilmiştir. Öğrenciler ve senaryolar rastgele eşleştirilerek uygulama gerçekleştirilmiştir. Öğrenci sayılarındaki farklılık nedeniyle, 25 eczacılık fakültesi öğrencisi 2'şer eczane hizmetleri programı öğrencisiyle, 1 eczacılık öğrencisi ise 1 eczane hizmetleri programı öğrencisi ile rastgele eşleştirilmiştir. Dört farklı senaryoda iki farklı standart hasta sırayla görev almıştır. Senaryolarla ilgili bilgiler Tablo 1'de yer almaktadır.

Tablo 1. Senaryolar

Senaryo numarası	Senaryo adı	Senaryo konusu
1	Hasta 1: Reçetesiz ürün talebi - iv müstahzar	Reçete karşılığında verilmesi gereken ürünlerin, endikasyonu dışında kullanımı için reçete olmadan talep edilmesi
	Hasta 2: Kullanım bilgisi verilmesi - Suppozituar	Reçete ile gelen hastaya, dozaj formunu dikkate alarak, ilaç kullanım bilgisi verilmesi
2	Hasta 1: Reçetesiz ürün talebi - Ağrı kesici	Reçete ile verilmesi gereken ürünün, hekim kontrolü ve reçete olmadan talep edilmesi
	Hasta 2: Kullanım bilgisi verilmesi - Çocuk hasta	Reçete ile gelen hastaya, ilacın dozunu dikkate alarak, ilaç kullanım bilgisi verilmesi
3	Hasta 1: Kullanım bilgisi verilmesi - Alerji	Reçete ile gelen hastaya, ilacın yan etkilerini dikkate alarak, ilaç kullanım bilgisi verilmesi
	Hasta 2: Mahremiyet	Reçete ile gelen ancak endikasyonu nedeniyle utangaç davranan hastaya, mahremiyete dikkat edilerek ilaç kullanım bilgisi verilmesi
4	Hasta 1: Kullanım bilgisi verilmesi - Damla	Reçete ile gelen hastaya, dozaj formunu dikkate alarak, ilaç kullanım bilgisi verilmesi
	Hasta 2: Kullanım bilgisi verilmesi - Miyalji	Reçete ile gelen hastaya, ilacın yan etkilerini dikkate alarak, ilaç kullanım bilgisi verilmesi

Standart hasta görüşmeleri iki farklı oturumda gerçekleştirilmiştir. Görüşmelerin tamamlanmasının ardından çözümleme oturumu yapılmış ve bu oturumun sonunda, gönüllü olarak geri bildirimde bulunmak isteyen öğrencilerin geri bildirimleri, araştırmacılar tarafından hazırlanan ve Tablo 2'de yer alan açık uçlu soruları içeren formlar aracılığıyla alınmıştır.

### Veri analizi

Öğrencilerden yazılı olarak alınan geri bildirimler, öğrencilerin gizliliğini koruyacak şekilde, bilgisayar ortamına aktarılmış ve içerikleri MaxQDA v11 programı kullanılarak, betimsel analiz aşamalarına uygun bir şekilde incelenmiştir. Araştırmanın güvenilirliğini artırmak amacıyla da

araştırmacı çeşitliliğine gidilmiş, veriler üç farklı araştırmacı tarafından incelenmiş ve uzlaşma sağlanan temalar belirlenmiştir.

**Tablo 2.** Geri bildirim formu

Soru No	Konu	Soru
1	Eczacılık eğitimi	Aldığınız eğitimin, mesleki uygulamalarla örtüşmesi için, hangi eksikliklerin giderilmesi gerektiğini düşünüyorsunuz?
2		Eğitimde hangi konulara yer verilmesi gerektiğini düşünüyorsunuz?
3	Simülasyon uygulaması	Simülasyon uygulamasının mesleki uygulamalara katkı sağlayıp sağlamayacağı konusundaki görüşleriniz nelerdir?
4		Simülasyon uygulamasının iletişim becerilerinin gelişmesine katkı sağlayıp sağlamayacağı konusundaki görüşleriniz nelerdir?
5		Simülasyon laboratuvarındaki uygulama sırasında gördüğünüz olumlu ve olumsuz yanlar nelerdir?
6		Simülasyon uygulamasının eğitim programında yer alıp almaması konusundaki görüşleriniz nelerdir?
7	Öneri ve ekler	Ekleme istedikleriniz ve önerileriniz nelerdir?

### Araştırmanın sınırlılıkları

Eczacılık Fakültesi ve Eczane Hizmetleri Programı öğrencilerinin, standart hasta görüşmesinin yer aldığı bir meslekler arası eğitim uygulamasına yönelik geri bildirimlerinin alındığı bu çalışma, yalnızca iletişim becerileri ile ilgili bilgilerin verildiği dersleri alan ve çalışmaya katılmada gönüllü olan öğrencilerle gerçekleştirilerek, sınırlı bir temsil sağlanmıştır. Ayrıca, çalışmanın tamamlanmasının hemen ardından, bulgular doğrultusunda, eğitim programında değişiklikler yapılmasına yönelik girişimlerde bulunulmuş ve çalışmanın raporlanması için bu girişimlerin sonuçlanması beklenmiştir.

### SONUÇ VE TARTIŞMA

Eğitim süreçlerinde öğrencilerden geri bildirim alınmasının, ilgili eğitim programında, iyileştirme ve geliştirmeler yapılması açısından önem taşıdığı bilinmektedir [24-26]. Bu çalışma kapsamında da öğrencilerden alınan geri bildirimlerden yola çıkarak, eczacının ve eczane teknikerinin gelişen rolleri ve iş birliği konusunda farkındalık kazanmalarına yönelik eğitim sürecinde değişiklikler yapılması mümkün olmuştur.

Çalışma kapsamında uygulamaya katılan 27 eczacılık fakültesi öğrencisi (%100) ve 49 eczane hizmetleri programı öğrencisi (%96) gönüllü olarak geri bildirimde bulunmuştur. Öğrencilerin sorulara verdikleri yanıtlar “eczane içi etkileşim”, “görev paylaşımı”, “eğitim çıktıları” ve “fiziksel ortam” temaları altında toplanmıştır. Temaları oluşturan alıntılardan örnekler; eczacılık öğrencileri “E”, eczane hizmetleri programı öğrencileri “T” ve uygulama sırasında kodlanan numaralarla temsil edilecek şekilde sunulmaktadır.

#### Eczane içi etkileşim

Geri bildirimlerini paylaşan öğrenciler arasında, birlikte çalışma ortamının deneyimlenmesinde zorlandıklarını belirten öğrenciler bulunmaktadır. Katılımcılar uygulama öncesinde eczacı ve teknikerlerin birbirini tanımamalarının uygulama sırasında etkileşimi zorlaştırdığını, ancak uygulama sayesinde karşılaşılabilecekleri durumlar hakkında bilgi edindiklerini belirtmişlerdir:

*“Eczacı teknikeri ile evveliyattan diyalog kurulmamış olması, kimi durumlarda çekinceli davranışlara itmiş olabilir katılımcıları. Bu da iş birliğini azaltıp verimi düşürmüş olabilir.”* (E1)  
*“Eczacı arkadaşlarla aramızda bir diyalog olmadığından, birbirimizi anlamamız zor oldu.”* (T21)

Bununla birlikte, sözsüz iletişimin ve davranışların eczane içi etkileşimi iyileştirmedeki rolü, öğrenciler tarafından dile getirilmiştir:

*“Uygulama başladığında, bu bizi rahatlatmıştı. Tabii eczacıların güler yüzlü olması, iş birliği yaparak, orada çalışmak benim açımdan olumluydu. Eğer eczacı güler yüzlü olmasaydı, iletişimde kopukluk olabilirdi.” (T9)*

*“Çalıştığım tekniker arkadaşlarımla göz teması kurarak, onlara gelen reçeteleri kapmadan onların ilgilenip, sonra bana yöneltmesini sağlamak, bir şey isteyeceğim zaman kibar ve sevecen bir tavırla istemek, beni bu stres ve heyecan altında gerçekten zorladı.” (E2)*

Ayrıca, öğrenciler simülasyon ortamında, standart hastalarla kurdukları etkileşimin stajları sırasında gerçek hastalarla kurdukları etkileşimle farklılıklarını da paylaşmışlardır:

*“Kendi açımdan, eczacılık açısından düşündüğümde; şunu özellikle ve altını çizerek belirtmek istiyorum ki, simülasyon uygulamasında hastalarla kurduğum iletişimi, 1,5 aylık serbest eczane stajında kurmadım. Simülasyon sayesinde birebir hastayla konuşma fırsatı buldum.” (E3)*

Bütün bunlarla birlikte, simülasyon uygulaması ile eczacı ve eczane teknikerinin iş birliğine ilişkin farkındalığın oluştuğu ve bu iletişime dair elde edilen kazanımlar ifade edilmiştir:

*“Eczane teknikeri ve eczacı arasındaki iletişimin kopuk olmaması gerek. Ancak bu simülasyonda onu fark ettim.” (E5)*

*“Eczane teknisyenleri ile iletişimin görülmesi, panik anında hangi tavrı takınmamız gerektiği ve hasta iletişimi konusunda bize deneyim sağlamıştır.” (E7)*

Gelişen eczacılık uygulamaları ve hasta odaklı yaklaşım ile eczacı, görevlerini gerçekleştirirken, daha çok gözlemci ve danışman rolünde yer almaktadır. Eczacı rolünün değişimi, eczacının bir ekip içerisinde çalışması gerekliliğini arttırmaktadır. Bu kapsamda eczane teknikerleri, eczacı ile birlikte çalışan ve eczacılık hizmetlerinin sunumunda destek olan bir meslek grubudur [27]. Eczane teknikerleri, eczacılık hizmetlerinin sunumu noktasında, destek vererek, eczacının zamanını daha verimli kullanmasını sağlamak ve eczacılık hizmetlerinin etkin bir biçimde yerine getirilmesinde rol oynamaktadır [28]. Mezuniyet sonrası, aynı ekibin parçası olacak bu iki grubun, iş birliği içerisinde çalışabilmeleri için, mezuniyet öncesi eğitim süreçlerinde, birbirlerini tanımaları büyük önem taşımaktadır. Çalışmaya katılan öğrencilerin geri bildirimlerinde de meslekler arası işbirliğinin sağlanması ve farklı meslek gruplarının birbirilerini tanıyarak, iletişim kurabilmeleri için, yapılan uygulamanın faydalı olduğu dile getirilmiştir.

### **Görev paylaşımı**

Görev paylaşımına ilişkin geribildirimler hem olumlu hem de olumsuz düşünce ve deneyimler olarak ifade edilmiştir. Bu kapsamda bazı eczacılar, teknikerler ile birlikte çalışmanın kendileri açısından olumlu yönlerini ifade ederken, teknikerler ise birlikte çalışmanın güven verici bir etkisi olduğuna dikkat çekmişlerdir:

*“Simülasyon sayesinde, eczane teknikerinin eczane içinde eczacının işlerini kolaylaştıran, hastaya daha fazla vakit ayırmamızı sağlayan çalışan olduğunu gördüm.” (E6)*

*“Hastalar içeri girdikten sonra benim yapmam gerekeni söyleyip, beni yönlendirerek, daha rahat davranmamı sağladı.” (T27)*

Bununla birlikte, teknikerler eczacılarla birlikte çalışırken, kendilerinin arka planda kaldıklarını, eczacılar ise bu görev paylaşımından memnun olduklarını belirtmişlerdir:

*“Eczane teknikeri olarak, çok arka planda kaldığımızı düşünüyorum... Genellikle eczacılar ilgilendi. Bizler sadece getir götür işlerini yaptık.” (T43)*

*“... Ama genel olarak, hasta gelince tekniker arkadaşlar hastanın reçetesindeki ilaçları bize sormadan direkt karşılamadı. Bu durum beni mutlu etti.” (E11)*

*“Ben onların bana sormadan ilaç verip göndermesini istemiyordum. Her ikisi de buna dikkat etti ve bana danıştılar.” (E23)*

Geri bildirimde bulunan öğrenciler, simülasyon ortamında bir araya gelmeleri sayesinde, mezuniyet sonrasında neler yapabilecekleri konusunda fikir sahibi olduklarını da belirtmişlerdir. Bilgilerin ve davranışsal pratiklerin öğrenilmesinde en etkili yöntemin, gerçek dünyaya benzer bir ortamda ve yaşanması muhtemel olaylarla deneyimlenmesinin en etkili yöntem olduğu bilinmektedir [29]. Bu kapsamda meslekler arası eğitim uygulamaları, her bir ekip üyesinin kendi rol, görev ve yetkilerini anlamada, karar verme süreçlerini henüz öğrencilik döneminde deneyimleme fırsatı vermekte ve iş birliği içerisinde çalışma kültürüne katkı sağlamaktadır [30]. Mezuniyet sonrası iş yaşamında

meslekler arası iş birliği ve ekip çalışmasının yönetimine yönelik yetkinliklerin kazanılabilmesi için, en uygun dönemin mezuniyet öncesi dönem olarak ifade edildiği çalışmalar bulunmaktadır [14]. Bu açıdan, öğrencilerin simülasyon uygulaması ile deneyimlediği bir ekip olarak çalışma ile ilgili düşünceleri, literatürde yer alan çalışmalarla örtüşmektedir.

### Eğitim çıktıları

Eczacılık Fakültesi öğrencileri, simülasyon uygulamasının zorunlu ders kapsamında herkes tarafından yapılması gerektiğini belirtmiş, öğrencilerin iletişim becerileri üzerindeki olumlu etkilerinden bahsetmiş, takım çalışmasının önemini vurgulamışlardır:

*“Eczane açmayı düşünen veya hastane eczanesinde çalışmayı planlayanlar için zorunlu seçmeli haline getirilmeli.”* (E1)

*“Bu uygulamayla her öğrencinin iletişim kabiliyeti görülerek, eksikliği olanların tamamlamalarına fırsat sağlayacağını düşünmekteyim.”* (E3)

*“Bu uygulama sonrasında, iletişim konusunun ne denli önemli bir şey olduğunu anladım ve ekip çalışmasının önemini kavradım.”* (E2)

*“Hasta-tekniyer arasındaki iletişime zarar vermeden, hasta ile iletişime nasıl geçileceğini, tekniyer ile olan ilişkinin hastaya yansımaları açısından çok önemli olduğunu gördüm. Bu nasıl olabilir bu konu üzerinde simülasyon örnekleri üzerinden yol-yöntem bulunabilir.”* (E13).

Tekniyerlik programı öğrencileri ise, iletişim hususundaki katkılardan bahsetmişler ve uygulamanın iletişim ile ilgili farkındalıklarına olan katkısını dile getirmişlerdir:

*“Karşılıklı iletişim ve müşteriyle olan göz teması, konuşmadaki düzgünlüğü ayarlamak, ses tonumu nasıl ayarlayacağımı görmek, benim için geri dönüşü yüksek olan bir şeydi.”* (T31)

*“Meslekler arası iletişim açısından ve staj için, ilk heyecan ve stresten kurtulmamız açısından da oldukça faydalı bir eğitimdi.”* (T21)

Eğitimde simülasyon uygulamalarına yer verilmesi, farklı teknik becerilerin yanı sıra, teknik olmayan becerilerin gelişimi açısından da önem taşımaktadır. Bu konuda, Görüş ve ark. tarafından yapılmış bir çalışmada, hemşirelik eğitiminde, simülasyon uygulamalarının yapılmasının deneyime olanak veren bir ortam sunması, öğrencilerin hem özgüvenlerinin artmasına hem de karar verme yetilerine katkı sağladığı belirtilmekte, bununla beraber, ekip çalışması ve yönetim becerilerinin de gelişmesini sağladığı ifade edilmektedir [31]. Simülasyon uygulamalarına ilişkin öğrenci görüşlerinin değerlendirildiği bir başka çalışmada, öğrencilerin bu uygulamaların becerilerine katkıda bulunup, stresi azalttığını ve kendilerine güvenlerini artırdığını ifade ettikleri belirtilmiştir. Üniversitelerinde simülasyon laboratuvarı bulunmayan öğrencilerin ise, maket benzeri materyalleri yeterli bulmadığı ve teorik bilgilerini bir araya getirerek, uygulamaya geçmede sorunlar yaşadıkları ifade edilmiştir [32].

Çalışmamız kapsamında, öğrenciler simülasyon uygulamalarının kendilerine katkılarında bahsetmiş, simülasyon uygulamalarının zorunlu seçmeli dersler kapsamında gerçekleştirilmesi gerektiğini ifade etmişlerdir. Öğrencilerin bu geri bildirimlerinden yola çıkarak, uygulamanın hayata geçirilmesinde, ön bilgilendirmelerin geliştirilmesi ve eğitim çıktılarının değerlendirilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bunun sonucunda, eczacılık fakültesinde müfredat güncelleme yapılarak, teknik olmayan beceriler üzerine simülasyon uygulamalarının yer aldığı zorunlu ders içeriği hazırlanmıştır. Ayrıca, söz konusu uygulamanın yapıldığı eczacılık fakültesi dışında, Türkiye’de farklı eczacılık fakültelerinde de simülasyon uygulamaları yaygınlaşmaya başlamıştır [33, 34].

### Fiziksel ortam

Öğrencilerin geri bildirimlerinde, uygulamanın gerçekleştirildiği ortamla ilgili görüşleri ve önerileri de yer almıştır:

*“Simülasyonun uygulandığı alanın büyütülmesi ve daha çok ilacın yerleştirilmesi iyi olabilir.”* (E5)

*“İlaç hazırlanacak ortam hazırlanabilir. Ortama bazı koliler eklenebilir.”* (T1)

*“Simülasyonun olduğu ortamın daha geniş olması daha iyi olurdu, ortam açısından... Daha rahat hareket edebilmek açısından...”* (T16)

*“Geniş bir alan olsa ve banko geniş olsa daha rahat hareket edebirdik. Ortamı önceden tanısaydık, özgüvenimiz daha yüksek olurdu.”* (E7)

Katılımcılar tarafından, simülasyon eczanesinde yer alan cihazlar ve ortam açısından olumlu görüşler dile getirilmiş ve gerçekçi olduğu ifade edilmiştir.

*“Eczane ortamının gerçekçiliği... Karekod okuma cihazı ve yazar kasa ve hatta kasada paralar bile vardı.”* (E3)

*“Onun dışında eczane ortamı hasta karşılamak için yeterli ve samimi bir ortamdı.”* (P18)

Simülasyon ortamının, simülasyon sonucunda elde edilen çıktıları etkilediği ve önemli bir parametre olduğu bilinmektedir [15]. Fejzic ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada öğrencilerin gerçekçi bir ortamda uygulama yapmasının, kendilerine katkı sağladığını belirttiği ifade edilmiştir [35]. Çalışmamız kapsamında katılımcılar da simülasyon ortamının gerçekçiliğine dikkat çekmişler, ancak bununla birlikte alan yetersizliği, eczane ortamı açısından daha farklı eklemelerin yapılabileceğini de dile getirmişlerdir. Öğrencilerden alınan bu geri bildirimlerden yola çıkarak, bu çalışmada kullanılan eczane simülasyon laboratuvarı; ilaç dolaplarına eklemeler yapılması, majistral ürün hazırlamada kullanılan ekipmanlara ve ilaç bilgi sistemlerini içeren cihazlara yer verilmesi gibi düzenlemelerle, gerçek eczane ortamına daha çok benzeyecek şekilde yeniden düzenlenmiştir.

Türkiye’de eczane teknikerliği ve eczacılık öğrencilerinin simülasyon uygulamasındaki iş birliğine yönelik gerçekleştirilen ilk çalışmalar arasında yer alan bu araştırma kapsamında, öğrencilerin uygulamayla ilgili değerlendirmelerini almak mümkün olmuştur. Meslekler arası iş birliğine yönelik eczacılık alanındaki literatürde yapılan diğer çalışmalarla benzer bulgular elde edilen bu çalışmada, öğrencilerin iş bölümüne yönelik değerlendirmelerinin, iş birliğinin temellerinin atılması açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, çalışmamızın sonuçları ışığında, eğitim programında yapılan güncellemelerin mesleki uygulamalara olumlu katkıları olacağına inanılmaktadır.

## TEŞEKKÜR

Çalışmaya gönüllü olarak katılan “Eczacılık Fakültesi” ve “Eczane Hizmetleri Programı” öğrencilerine teşekkür ederiz. Bu çalışmanın ön bulguları, 2018 yılında düzenlenen “20. International Social Pharmacy Workshop”ta poster bildiri olarak sunulmuştur.

## YAZAR KATKILARI

Kavram: B.S.Ş., E.U.D., M.E., S.Y.; Tasarım: B.S.Ş., E.U.D., M.E., S.Y.; Denetim: B.S.Ş., E.U.D., L.Y., M.E., S.Y.; Kaynaklar: B.S.Ş., E.U.D., M.E., S.Y.; Malzemeler: -; Veri Toplama ve/veya İşleme: B.S.Ş., E.U.D.; Analiz ve Yorumlama: B.S.Ş., E.U.D., L.Y.; Literatür Taraması: B.S.Ş., E.U.D., L.Y., M.E., S.Y.; Kritik İnceleme: B.S.Ş., E.U.D., L.Y., M.E., S.Y.; Diğer:-

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

## ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Etik Komisyonu’ndan 02.12.2016 tarih ve 35853172/431-3734 sayılı izin kapsamında gerçekleştirilmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Goolsarran, N., Hamo, C.E., Lane, S., Frawley, S., Lu, W.H. (2018). Effectiveness of an interprofessional patient safety team-based learning simulation experience on healthcare professional trainees. BMC Medical Education, 18(1), 1-8. [\[CrossRef\]](#)
2. Reeves, S., Clark, E., Lawton, S., Ream, M., Ross, F. (2017). Examining the nature of interprofessional interventions designed to promote patient safety: a narrative review. International Journal for Quality in Health Care, 29(2), 144-150. [\[CrossRef\]](#)
3. Dener, H., Elçin, M. (2015). Mesleklerarası öğrenme hakkında Hacettepe Üniversitesi doktor ve hemşireleri ile tıp ve hemşirelik öğrencilerinin hazırbulunuşluk düzeylerinin karşılaştırılması. Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi, 29(2), 109-117. [\[CrossRef\]](#)

4. Pevnick, J.M., Nguyen, C., Jackevicius, C.A., Palmer, K.A., Shane, R., Cook-Wiens, G., Rogatko, A., Bear, M., Rosen, O., Seki, D., Boyle, B., Desai, A., Bell, D.S. (2018). Improving admission medication reconciliation with pharmacists or pharmacy technicians in the emergency department: A randomised controlled trial. *BMJ Quality & Safety*, 27(7), 512-520. [CrossRef]
5. World Health Organization Web site. (1997). Erişim adresi <https://apps.who.int/iris/handle/10665/63817> Erişim tarihi: 10.04.2022
6. Sam, A.T., Parasuraman, S. (2015). The Nine-Star Pharmacist: An Overview. *Journal of Young Pharmacists*, 4, 281-284. [CrossRef]
7. Resmi Gazete Web site. (2014). Erişim adresi <https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=19696&MevzuatTur=7&MevzuatTertip=5> Erişim tarihi: 10.04.2022
8. Bosch, B., Mansell, H. (2015). Interprofessional collaboration in health care: Lessons to be learned from competitive sports. *Canadian Pharmacists Journal*, 148(4), 176-179. [CrossRef]
9. Bridges, D.R., Davidson, R.A., Odegard, P.S., Maki, I.V., Tomkowiak, J. (2011). Interprofessional collaboration: Three best practice models of interprofessional education. *Medical Education Online*, 16(1), 6035. [CrossRef]
10. Centre For The Advancement of Interprofessional Education Web site. (2022). Erişim adresi <https://www.caipe.org/> Erişim tarihi: 23.06.2022
11. Fernandez, R., Parker, D., Kalus, J.S., Miller, D., Compton, S. (2007). Using a human patient simulation mannequin to teach interdisciplinary team skills to pharmacy students. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 71(3), 51. [CrossRef]
12. Sözen-Şahne, B., Ulutaş-Deniz, E., Yeğenoğlu, S. (2017). Eczacılık eğitiminde simülasyon uygulamaları. *Türkiye Klinikleri J Med Education-Special Topics*, 2(2), 81-85.
13. Vyas, D., Bray, B.S., Wilson, M.N. (2013). Use of simulation-based teaching methodologies in us colleges and schools of pharmacy. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 77(3), 53. [CrossRef]
14. Onan, A., Turan, S. (2017). Mezuniyet öncesinde mesleklerarası eğitim. *Türkiye Klinikleri J Med Education-Special Topics*, 2(2), 111-116.
15. Mıdık, Ö., Kartal, M. (2010). Simülasyona dayalı tıp eğitimi. *Marmara Medical Journal*, 23(3), 389-399.
16. Horsburgh, M., Lamdin, R., William, E. (2001). Multiprofessional learning: The attitudes of medical, nursing and pharmacy students to shared learning. *Medical Education*, 35, 876-883. [CrossRef]
17. Buring, S.M., Bhushan, A., Broeseker, A., Conway, S., Duncan-Hewitt, W., Hansen, L., Westberg, S. (2009). Interprofessional education: Definitions, student competencies, and guidelines for implementation. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 73(4), 59. [CrossRef]
18. Marion-Martins, A.D. Pinho, D.L. (2020). Interprofessional simulation effects for healthcare students: A systematic review and meta-analysis. *Nurse Education Today*, 104568. [CrossRef]
19. Epps, C.A., Britt, T., Palaganas, J.C. (2020). Using health care simulation for interprofessional education and practice. In: J. Palaganas, B. T. Ulrich, M. E. Mancini (Eds.), *Mastering Simulation: A Handbook for Success* (pp. 151-175). Indianapolis: Sigma Theta Tau International.
20. Sarmasoğlu, S., Elçin, M., Masiello, I. (2018). Eğiticilerin başarılı mesleklerarası eğitim programlarına ilişkin deneyimleri: Karolinska Enstitüsü örneği. *Hacettepe Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Dergisi*, 5(1), 14-28. [CrossRef]
21. Bolesta, S., Chmil, J.V. (2014). Interprofessional education among student health professionals using human patient simulation. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 78(5), 94. [CrossRef]
22. Mohaupt, J., van Soeren, M., Andrusyszyn, M., MacMillan, K., Devlin-Cop, S., Reeves, S. (2012). Understanding interprofessional relationships by the use of contact theory. *Journal of Interprofessional Care*, 26(5), 370-375. [CrossRef]
23. Davies, M., Schonder, K., Meyer, S.M., Hall, D.L. (2015). Changes in student performance and confidence with a standardized patient and standardized colleague interprofessional activity. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 79(5), 69. [CrossRef]
24. Zimbardi, K., Colthope, K., Dekker, A., Engstrom, C., Bugarcic, A., Worhty, P., Chunduri, P., Lluca, L., Long, P. (2017). Are they using my feedback? The extent of students' feedback use has a large impact on subsequent academic performance. *Assessment & Evaluation in Higher Education*, 42(4), 625-644. [CrossRef]
25. Shah, M., Pabel, A. (2020). Making the student voice count: Using qualitative student feedback to enhance the student experience. *Journal of Applied Research in Higher Education*, 12(2), 194-209. [CrossRef]
26. Mandouit, L. (2018). Using student feedback to improve teaching. *Educational Action Research*, 26(5), 755-769. [CrossRef]

27. Albanese, N.P., Rouse, M.J., Schlaifer, M. (2010). Scope of contemporary pharmacy practice: Roles, responsibilities, and functions of pharmacists and pharmacy technicians. *Journal of the American Pharmacists Association*, 50, e35-e69. [CrossRef]
28. Koehler, T., Brown, A. (2017). A global picture of pharmacy technician and other pharmacy support workforce cadres. *Research in Social and Administrative Pharmacy*, 13, 271-279. [CrossRef]
29. Khan, K., Pattison, T., Sherwood, M. (2011). Simulation in medical education. *Medical Teacher*, 33, 1-3. [CrossRef]
30. Boztepe, H., Terzioğlu, F. (2015). Sağlık eğitiminde mesleklerarası eğitim. *Anadolu Hemşirelik ve Sağlık Bilimleri Dergisi*, 15(3), 222-228.
31. Göriş, S., Bilgi, N., Korkut-Bayındır, S. (2014). Hemşirelik eğitiminde simülasyon kullanımı. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(2), 25-29.
32. Çetinkaya-Uslusoy, E. (2018). Hemşirelik eğitiminde simülasyon kullanımı: Öğrencilerin görüşleri. *SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(2), 13-18. [CrossRef]
33. Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Web site (2018). Erişim adresi <https://atauni.edu.tr/tr/mesleki-beceri-ve-iletisim-laboratuvari-simulasyon-eczanesi-acilisi-yapildi> Erişim Tarihi: 23.06.2022
34. Gülpınar, G., Özçelikay, G. (2021). Development of a structured communication and counseling skills course for pharmacy students: A simulation-based approach. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18, 176-184. [CrossRef]
35. Fejzic, J., Barker, M., Hills, R., Priddle, A. (2016). Communication capacity building through pharmacy practice simulation. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 80(2), 28. [CrossRef]





# EXAMINATION OF THE AERIAL PARTS OF *CLINOPODIUM PAMPHYLICUM* SUBSP. *DAVISII* (CONTANDR. & QUÉZEL) GOVAERTS IN TERMS OF ANTIOXIDANT AND ENZYME INHIBITION POTENTIALS, TOGETHER WITH PHENOLIC PROFILE

*CLINOPODIUM PAMPHYLICUM* SUBSP. *DAVISII* (CONTANDR. & QUÉZEL)  
GOVAERTS TOPRAK ÜSTÜ KISIMLARININ ANTİOKSİDAN VE ENZİM İNHİBİSYON  
POTANSİYELİ VE FENOLİK PROFİLİNİN İNCELENMESİ

Nuraniye ERUYGUR<sup>1\*</sup> , Fatma AYAZ<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Selçuk University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 42250 Konya, Turkey

## ABSTRACT

**Objective:** The family Lamiaceae, consists of medicinal and aromatic plants, is represented by 46 genera and 571 species in Turkey. Traditional uses for *Calamintha* Miller species include utilizing as a spice, stimulant, antispasmodic, diaphoretic, expectorant, as well as treatment for stomach and throat aches. *C. pamphylica* subsp. *davisii* (Contandr. & Quézel) P.H. Davis is accepted as synonym of *Clinopodium pamphylicum* subsp. *davisii* (Contandr. & Quézel) Govaerts. *C. pamphylicum* subsp. *davisii* is an endemic species to Turkey. Until now, no biological and phytochemical research has been reported on this plant except for its essential oil research. Examining the antioxidant, and enzyme inhibition effects of *C. pamphylicum* subsp. *davisii*, as well as determining its phytochemical composition were the targets of the current study.

**Material and Method:** To evaluate *in vitro* antioxidant potential (DPPH, ABTS, iron chelating, total phenol and flavonoid amounts) and enzyme inhibitory activities, such as acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase and tyrosinase for *C. pamphylicum* subsp. *davisii* were measured with spectrophotometric methods. The quantities of different phenolic acids and flavonoids were measured using HPLC to analyze the phenolic composition of the plant extracts.

**Result and Discussion:** Our results indicated that except for iron chelating methanol extract exhibited higher antioxidant properties over water extract using DPPH, and ABTS methods. In addition, methanol extract displayed more inhibition on the tested enzymes except for acetylcholinesterase, and  $\alpha$ -glucosidase than water extract. As for HPLC findings, although

\* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Nuraniye Eryugur  
e-mail / e-posta: nuraniye.eryugur@selcuk.edu.tr, Phone / Tel.: +03322234965



*chlorogenic acid was signified as the main phenolic compound for the methanol extract, caffeic acid was specified as the major phenolic for the water extract. These results provide a scientific basis for C. pamphylica subsp. davisii, which possessed the traditional uses in Turkish folk medicine.*

**Keywords:** Antioxidant activity, *clinopodium pamphylicum*, enzyme inhibition activity, phenolic compounds

## ÖZ

**Amaç:** Tıbbi ve aromatik bitkilerden oluşan Lamiaceae familyası Türkiye'de 46 cins ve 571 tür ile temsil edilmektedir. *Calamintha Miller* türlerinin geleneksel kullanımları arasında baharat olarak, uyarıcı, spazm giderici, terletici, balgam söktürücü etkileri ve bunun yanı sıra mide ve boğaz ağrılarının tedavisi yer alır. *C. pamphylica subsp. davisii* (Contandr. & Quézel) P.H. Davis *Clinopodium pamphylicum subsp. davisii* (Contandr. & Quézel) Govaerts bitkisinin sinonim ismi kabul edilmiştir. *C. pamphylicum subsp. davisii* Türkiye'ye endemik bir türdür. Şimdiye kadar, bu bitki üzerinde uçucu yağ araştırmaları dışında herhangi bir biyolojik ve fitokimyasal araştırma bildirilmemiştir. *C. pamphylicum subsp. davisii*'nin antioksidan ve enzim inhibisyonu etkilerinin incelenmesi ile birlikte fitokimyasal bileşenlerinin değerlendirilmesi bu çalışmanın amaçlarıdır.

**Gereç ve Yöntem:** *C. pamphylicum subsp. davisii*'nin *in vitro* antioksidan potansiyelini (DPPH, ABTS, demir şelasyon, Toplam fenolik madde ve flavonoid miktarı) ve asetilkolinesteraz, butirilkinesteraz,  $\alpha$ -glukozidaz,  $\alpha$ -amilaz ve tirozinaz gibi enzim inhibitör aktiviteleri spektrofotometrik yöntemler kullanılarak ölçülmüştür. Bitki ekstraktlarının fenolik bileşimini HPLC kullanılarak analiz etmek için birçok fenolik asit ve flavonoidin miktarları hesaplanmıştır.

**Sonuç ve Tartışma:** Sonuçlarımız demir şelasyon dışındaki DPPH ve ABTS yöntemleri ile metanol ekstresinin sulu ekstreden daha yüksek antioksidan özellik sergilediğini göstermiştir. Ayrıca, metanol ekstresi, test edilen asetilkolinesteraz ve  $\alpha$ -glukozidaz dışındaki enzimler üzerinde sulu ekstreden daha fazla inhibisyon sergilemiştir. HPLC sonuçlarına gelince, klorojenik asit metanol ekstresi için ana fenolik bileşik olarak belirlenirken, kafeik asit su ekstresinde başlıca fenolik olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, Türkiye'de halk arasında geleneksel kullanımları olan *C. pamphylica subsp. davisii* için bilimsel bir temel oluşturmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan aktivite, *clinopodium pamphylicum*, enzim inhibisyon aktivite, fenolik bileşikler

## INTRODUCTION

Diseases including cancer, cardiovascular issues, diabetes, cataracts, and neurological conditions are all influenced by reactive oxygen species, which are created by several cellular metabolic processes and environmental pollutants [1]. Plants and foods rich in phenolic compounds when they are taken into the body can prevent the development of these disorders by destroying free radicals that accumulate due to their antioxidant activity.

Diabetes mellitus is an important metabolic chronic disease that negatively affects the lives of many people in the world. Diabetes can be controlled by preventing  $\alpha$ -amylase, which is in duty of the digestion of carbs, from doing its function. Diabetes is also managed by blocking  $\alpha$ -glucosidase from doing its work, which involves absorbing glucose in the digestive system and causing postprandial hyperglycemia to decrease. Targeting digestive enzymes including  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase has proven to be successful in lowering blood sugar levels [2]. In addition, free radicals found to play a crucial part in the development of secondary diabetic disorders, because of the propensity to harm lipids, proteins, and DNA [3]. Agents of natural origin have become more attractive because they have minimal side effects and are better tolerated than other oral hypoglycemic agents currently used in antidiabetic therapy. To control diabetes, using plants with strong enzyme inhibitor and antioxidant properties can be a good treatment strategy.

Alzheimer's disease (AD) is a neurological disease that is frequently seen in the elderly and negatively affects their lives. According to studies, a significant decrease in the neurotransmitter called acetylcholine in the cerebral cortex is an important factor for this disease. Therefore, inhibition of acetylcholinesterase (AChE), which is responsible for the degradation of acetylcholine, has become one of the target treatment strategies in the treatment of AD [4]. The tyrosinase enzyme is involved in the melanin synthesis pathway in mammals, and by inhibiting this enzyme in skin problems caused by

overproduction of melanin, the synthesis of melanin is reduced, thus preventing hyperpigmentation [5]. In addition, tyrosinase inhibitors, including kojic acid and hydroquinone gain importance in cosmetology due to their skin lightening properties. Synthetic anti-pigmenting agents with tyrosinase inhibitory effect usually cause inflammation of the skin, so natural compounds with less side effects are sought as an alternative to synthetics. In recent years, the search for compounds with anti-pigmentation effect has increased for the use of plants to cosmetic purposes against skin diseases [6]. In addition, tyrosinase is closely associated with neurodegenerative processes in Parkinson's disease. Therefore, the search for tyrosinase enzyme inhibitors has become important, mostly in agricultural, cosmetic, and pharmaceutical sectors [7].

In Turkey, the Lamiaceae family, which includes bioactive and aromatic plants, is represented by 46 genera and 571 species [8]. Among the Lamiaceae genus, the habitat of *Calamintha* Miller includes North Africa, Eurasian, European, and East Mediterranean. Turkey contains 12 taxa and 9 species belonging to the genus, 5 of which are endemic to the country with a 45 percent endemism frequency [9]. The Turkish names for the *Calamintha* species include Güzel Nane, Dağ Nanesi, Miskotu, Tibbi Miskotu, and Yabani Oğulotu. They are traditionally utilized as spice, stimulant, spasmolytic, diaphoretic, expectorant, as well as to improve nervous, and gastrointestinal system, and treat renal diseases, stomach aches, and throat pain. *Calamintha pamphylica* Boiss. & Heldr. is an endemic species to Turkey, which has three subspecies, subsp. *pamphylica*, subsp. *Davisii* (Contandr. & Quézel) P.H. Davis, and subsp. *alanyense* S. Alan & Ocak. Until now, no biological and phytochemical research has been reported on these plants except for its essential oil research, and morphological comparison on these subspecies [10-14]. *C. pamphylica* subsp. *davisii*, hairy perennial herbaceous plant, is known as "kemer fesleğeni" (synonym, *Clinopodium pamphylicum* subsp. *davisii* (Contandr. & Quézel) Govaerts) and grown in limestone rocks, often forests of *Pinus brutia*, and *Cupressus sempervirens* [14,15]. The objectives of our investigation were to investigate the phenolic profiles of *C. pamphylicum* subsp. *davisii* extracts by HPLC, and to assess the antioxidant properties and enzyme inhibition potentials of the extracts.

## MATERIAL AND METHOD

### Plant Material

*C. pamphylicum* subsp. *davisii*, as a whole plant was collected from Yarikpinar canyon, located in Antalya province of Turkey in April 2018. The plant material was identified by a botanist specialist (Hayri Duman, Professor at Department of Biology), works in Gazi University. Voucher specimen was kept with herbarium number of 26912 in the KNYA, Selçuk University Faculty of Science Herbarium, Turkey.

### Extract Preparation

After the aerial part of plant material was dried in the shade, it was pulverized into fine powder by laboratory type miller. 10g of the powder were extracted in 100 ml methanol for 24h with shaking occasionally and filtered with Whatman filter paper No. 1. A rotary evaporator (Buchi, Switzerland) was used to concentrate the filtrates under vacuum at 40°C. The procedure was repeated for three times. The residue of plant materials was subjected to maceration with distilled water. After filtering, these extracts were refrigerated and lyophilized to yield water extract (Table 2). The extracts were kept in the refrigerator until utilization for *in vitro* assays.

### Quantitative Analysis of Phenolic Compounds by HPLC

The extracts were subjected to chromatographic analysis with High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), provided with diode array detector (DAD, G1315B). HPLC (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA), equipped with quaternary pump (G1311A), automatic injector system (G1329A), and thermostatted column (G1316A). A wavelength of 280 nm, which is typically employed for the simultaneous measurement of various phenolic compounds, was set on the DAD detector. During assessment, 1 ml of methanol was used to dissolve 25 mg of dry crude extract, and 10 µl of sample solution was injected. Separations on ACE 5 C18 (250 x 4.6mm; 5µm) column were carried

out at 30 °C with 0.8 ml/min flow rate. Gradient elution was utilized for the analysis, with the mobile phase A: B: C (80:12:8) water with 0.1% acetic acid (A), methanol with 0.1% acetic acid (B), and acetonitrile with 0.1% acetic acid (C). Elution program was proceeded with 80:12:8 (A: B: C) at 8 min, and the polarity was gradually increased by 25:60:15 at 40-45 min, then back to the mobile phase (80:12:8) to the recondition of column for 5 min. Before processing HPLC injections, extract samples and solvents for mobile phases were filtered via a 0.22 µm filtration system (Millipore Corp., Billerica, MA). Each sample was examined triplicate.

### **Total phenol (TPC) and flavonoid contents (TFC)**

The TPC and TFC for the methanol and water extracts of *C. pamphylicum* subsp. *davisii* were determined using spectrophotometric methods, such as Folin-Ciocalteu and aluminum chloride. TPC were expressed with mg gallic acid equivalents per g dry extract weight (mg GAE/g DW). The TFC were calculated mg equivalence of quercetin over g dry extract weight (mg QE/g DW).

### **Antioxidant Activity**

Antioxidant capabilities of plant-derived substances or extracts must be measured using methods that consider the mechanism of antioxidant activity. Therefore, in this investigation, the iron chelating and free radical scavenging tests were used to assess the antioxidant potential of the extracts. The DPPH and ABTS reduction spectrophotometric tests were used to estimate capability of the extracts for scavenging free radicals [16, 17]. The relationship between the extracts and the development of the ferrozine-Fe<sup>2+</sup> complex controlled the iron chelating properties of the extracts [18].

### **Enzyme inhibition potentials**

Anticholinesterase effects were assessed by altering the spectrometric techniques designed in advance [19]. The tyrosinase inhibition effect was also carried out using the reported earlier technique, with L-dopa serving as the substrate, and kojic acid serving as a standard agent [20]. Moreover, as initially disclosed, α-glucosidase inhibition effect was measured [21]. Additionally, the α-amylase inhibition experiment was subjected by adapting the procedure used by Caraway-Somogi iodine/potassium iodide method [22].

### **Statistical Data**

Every bioactivity test was conducted in tri plicate during the experimental procedures. Three parallel assessments' mean were utilized to summarize the results. The Tukey's test, and one-way ANOVA were used to show the correlation with Graphpad Prism 8.0 program.

## **RESULT AND DISCUSSION**

### **HPLC Analysis of Phenolics**

As shown in Table 1, the phenolic compounds of the methanol, and water extracts were quantified using HPLC. Chlorogenic acid, catechin, and vanillic acid were revealed to be the main constituents in the methanol extract of *C. pamphylicum* subsp. *davisii* (Figure 1), whereas caffeic acid, 4-hydroxy benzoic acid, and sinapic acid were shown to be the more predominate phenolic compounds in the water extract (Figure 2). As mentioned in the study, the phytochemical profiles of essential oils from *Calamintha* taxa were reviewed with the main compounds being piperitone oxide, pulegone, menthone, menthol, and menthyl acetate [11]. It was recorded that *C. pamphylicum* subsp. *davisii* essential oil mainly contained pulegone, menthol, menthone, and menthyl acetate in other study [12]. In another study, menthone (9.7-21.7%), menthyl acetate (9.8-20.9%), pulegone (5.6-19.7%), and menthol (7.4-15.4%) were determined as main components of the essential oil samples of *C. pamphylicum* subsp. *davisii* collected from different site [10]. According to the literature, there is no study on phytochemical investigation on the extracts of *C. pamphylicum* subsp. *davisii*. However, in a study, caffeoylquinic acid was determined as major compound for *C. nepeta* 80% methanol extract in the range 2.76 to 14.69 mg/g by HPLC [23]. In other study, phytotoxic phenolics of the ethyl acetate fraction from the aerial parts of *C. nepeta* were detected as gallic, and ferulic acids by HPLC using characterization and quantification

techniques [24]. Using LC-MS/MS method, acacetin and caffeic acid derivatives were identified as major components of hydroalcoholic extracts of *C. nepeta* in another investigation [25].

**Table 1.** The phenolic contents of *C. pamphylicum* subsp. *davisii* extracts ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ , n=3)

Analyte	Retention time (min)	Methanol extract	Water extract
Galic acid	4.69	-	-
3,4-dihydroxy benzoic acid	6.98	0.479	0.028
Catechin	7.97	1.217	-
Chlorogenic acid	8.79	1.517	0.03
4-hydroxy benzoic acid	10.65	-	0.547
1,2-dihydroxy benzene	11.09	0.111	-
Epicatechin	11.40	-	0.028
Vanilic acid	11.80	1.025	0.042
Caffeic acid	12.18	-	0.668
Vanilin	17.63	0.028	0.161
<i>p</i> -Coumaric acid	18.27	0.026	-
Sinapic acid	19.17	0.125	0.270
<i>Trans</i> -Ferulic acid	20.07	0.093	-
Elagic acid	21.17	0.230	-
Rutin	22.40	0.124	0.061
Salicylic acid	32.88	0.299	0.188
Quercetin	36.26	0.636	0.153
Kaempferol	39.97	0.132	0.033

### TPC and TFC

The highest TPC of *C. pamphylicum* subsp. *davisii* was measured in the methanol extract (104.16 mg GAE/g), followed by the water extract (24.05 mg GAE/g). The highest TFC was recorded for the methanol extract (81.37 mg QE/g), followed by the water extract (69.62 mg QE/g) (Table 2). Previous research has found that the amount of phenolic and flavonoid compounds in plant extracts is affected by

**Table 2.** Extract yield, total phenol and flavonoid amounts, and antioxidant activities of *C. pamphylicum* subsp. *davisii* methanol and water extracts<sup>a</sup>

Extract/Reference	Extract yield (% , g/g)	Total phenolic (mg GAEs/g) <sup>b</sup>	Total flavonoids (mg QEs/g) <sup>c</sup>	Antioxidant activity (IC <sub>50</sub> $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		
				DPPH	ABTS	Iron chelating
Methanol	10.88	104.16 $\pm$ 1.16	81.37 $\pm$ 5.89	506.0 $\pm$ 2.02	6.29 $\pm$ 0.42	3818 $\pm$ 1.33
Water	12.88	24.05 $\pm$ 5.31	69.62 $\pm$ 4.79	14685 $\pm$ 0.59	122.0 $\pm$ 0.91	619.8 $\pm$ 1.54
Quercetin		-	-	9.62 $\pm$ 0.09	-	
BHT		-	-	-	0.50 $\pm$ 0.23	
EDTA		-	-	-	-	437.3 $\pm$ 2.31

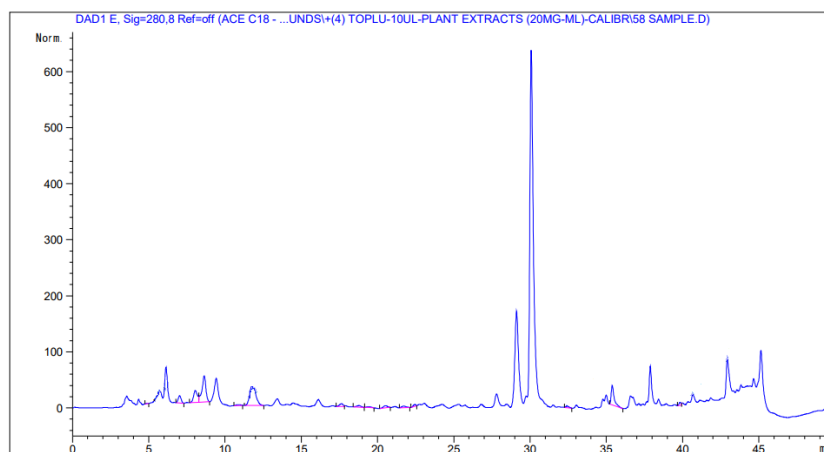
a: The data was presented as the averages  $\pm$  standard deviations of three parallel calculations. b: GAEs. Gallic acid equivalents ( $y = 0.003x + 0.0578$  gallic acid (mg) ( $r^2 = 0.999$ )); c: QEs. quercetin equivalents ( $y = 0.0068x + 0.0928$  quercetin (mg) ( $r^2 = 0.9982$ )).

the polarity of solvents used in the extraction procedures [26]. In accordance with our results, recent investigation indicated that *C. vulgaris* methanol extract contained 39.41 mg GAE/g for phenolic, and

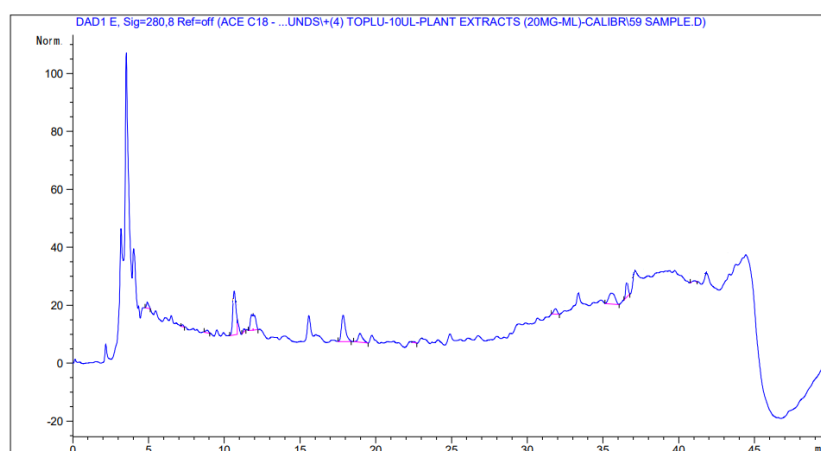
12.03 mg QE/g for flavonoid contents [27]. As for another work, total phenol ingredients of the methanol, and ethyl acetate extracts obtained from *C. nepeta* were identified as 143.52, and 351.47 mg chlorogenic acid equivalents/g dry plant material, respectively [24].

### Antioxidant Activity

The free radical scavenging abilities of the extracts of *C. pamphylicum* subsp. *davisii* were examined by using DPPH and ABTS techniques. The results were displayed in Table 2. The methanol extract exhibited the most superior levels of DPPH and ABTS radical scavenging abilities with  $IC_{50}$  values of  $506.0 \pm 2.02$  and  $6.29 \pm 0.42$   $\mu\text{g/ml}$ , respectively. This may be due to the strong radical scavenging activity of some phenolic compounds presents in the methanol extract. However, higher ferrous ion chelating activity was found in water extract ( $IC_{50}$ :  $619.8 \pm 1.54$   $\mu\text{g/ml}$ ) than the methanol extract ( $IC_{50}$ :  $3818 \pm 1.33$   $\mu\text{g/ml}$ ). In a study, *C. grandiflora* methanol extract ( $IC_{50}$ : 24  $\mu\text{g/ml}$ ) was shown to have more superior DPPH radical scavenging ability than that of *C. nepeta* subsp. *glandulosa* ( $IC_{50}$ : 67  $\mu\text{g/ml}$ ) [28]. In another study, the antioxidant activities of *C. glandulosa* plant extracts were assessed that the extracts were able to reduce DPPH radicals ( $IC_{50}$ : 0.51-4.40 mg/ml), and ABTS radicals ( $IC_{50}$ : 0.36-34.29 mg/ml) [29]. Our findings were found as lower than these results. The ferrous ion chelating potential of the essential oil from *C. incana* was observed to have low activity (1.94 mg EDTA equivalents per gram of oil) [30].



**Figure 1.** PHLC chromatogram of *C. pamphylicum* methanol extract



**Figure 2.** PHLC chromatogram of *C. pamphylicum* water extract

### Enzyme Inhibition Activity

In our work, enzyme inhibition effects of methanol and water extracts of *C. pamphylicum* subsp. *davisii* on AChE, BChE, tyrosinase,  $\alpha$ -glucosidase, and  $\alpha$ -amylase were presented an overview (Table 3). Both the extracts showed low anticholinesterase effects with  $IC_{50}$  459.3-33462  $\mu$ g/ml as compared with positive control galanthamine ( $IC_{50}$  28.16, and 27.34  $\mu$ g/ml for AChE, and BChE inhibition, respectively). The highest anti-BChE activity was exhibited in the methanol extract. In a research, AChE inhibition effects of the ethanol extracts of *C. grandiflora* and *C. officinalis* were shown to be moderate (around 62.5%), and the ethanol extract of *C. sylvatica* were exhibited to be low (around 25%) at 1 mg/ml concentration [31]. A comparison of these results with ours reveals that *C. pamphylicum* subsp. *davisii* water extract showed lower acetylcholinesterase inhibitory activity with 40.12% at the highest concentration (1000  $\mu$ g/ml) than the other *Calamintha* species above mentioned. In another investigation, *C. nepeta* essential oil, and its water extract were found to possess AChE inhibition effects with  $IC_{50}$  values 205.6, and 983.9  $\mu$ g/ml, respectively [32]. According to our findings, *C. pamphylicum* subsp. *davisii* was not active against AChE inhibitory than *C. nepeta*. In another study, *C. nepeta* methanol extract inhibited AChE with 48.78% at very high concentration (10 mg/ml) [23]. As for our findings, the highest BChE inhibitory activity was exhibited at the highest concentration (1000  $\mu$ g/ml) on the methanol extract of *C. pamphylicum* subsp. *davisii* with 65.59%. In similar research, *C. incana* essential oil was found to have no effect on the inhibition of AChE, and BChE [32]. Conversely, *C. nepeta* essential oil and its water extract possessed BChE inhibition effects with  $IC_{50}$  values 88.3, and 1669.9  $\mu$ g/ml, respectively [32].

As for anti-tyrosinase effects, of *C. pamphylicum* subsp. *davisii* methanol extract exhibited inhibition on tyrosinase ( $IC_{50}$ = 9431  $\pm$  0.27  $\mu$ g/ml), while the water extract was observed to be ineffective. In comparison with that of kojic acid ( $IC_{50}$ =107.3  $\pm$  0.66  $\mu$ g/ml), the methanol extract showed very weak inhibition effect. Otherwise, the methanol, and water extracts showed tyrosinase inhibition effects at 1000  $\mu$ g/ml with 36.65, and 32.70%, respectively. In a previous work, it was discovered that the essential oil of *C. incana* has a tyrosinase inhibition effect for 2.10 mg kojic acid equivalents for each gram of oil [30]. In other work, *C. nepeta* methanol extract exhibited anti-tyrosinase activity 38.45% inhibition at very high concentration (10 mg/ml) [23]. As compared this study, we found that similar inhibition data on *C. pamphylicum* at lower concentration (0.1 mg/ml).

*C. pamphylicum* subsp. *davisii* extracts were compared with positive control acarbose which inhibited  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase with  $IC_{50}$  values 259 and 825.7  $\mu$ g/ml, respectively. Although the methanol extract for  $\alpha$ -amylase inhibition effect exerted greater ( $IC_{50}$ =5756  $\mu$ g/ml) than water extract, the water extract for  $\alpha$ -glucosidase inhibition effect was found to have ( $IC_{50}$ =549.3  $\mu$ g/ml). As for the literature, the essential oil of *C. incana* showed acarbose equivalents/g essential oil on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effects with 0.34 and 0.10 mmol, respectively [30]. Furthermore, *C. nepeta* methanol extract exhibited inhibitory activity 16.45 and 66.62% against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase at 10 mg/ml [23]. In our results, the water extract of *C. pamphylicum* subsp. *davisii* exhibited inhibition effects of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase with 35.12, and 76.64% respectively. As compared with study on *C. nepeta*, we observed that *C. pamphylicum* subsp. *davisii* possessed higher inhibition effects on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase.

**Table 3.** Enzyme inhibition effects of *C. pamphylicum* subsp. *davisii* methanol and water extracts\* ( $IC_{50}$   $\mu$ g/ml)

Samples	AChE	BChE	Tyrosinase	$\alpha$ -glucosidase	$\alpha$ -amylase
Methanol extract	7469 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	459.3 $\pm$ 1.05 <sup>a</sup>	9431 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	N.A.	5756 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>
Water extract	1640 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>	33462 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>	N.A.	549.3 $\pm$ 1.98 <sup>a</sup>	15104 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>
Galanthamine	28.16 $\pm$ 2.01 <sup>b</sup>	27.34 $\pm$ 1.86 <sup>b</sup>	-	-	-
Kojic acid	-	-	107.3 $\pm$ 0.66 <sup>b</sup>	-	-
Acarbose	-	-	-	825.7 $\pm$ 1.03 <sup>b</sup>	259.4 $\pm$ 2.02 <sup>b</sup>

\*:  $IC_{50}$  values were presented as the averages plus standard deviations of three parallel calculations; a: Values were determined using the negative control method; b: Reference agent; N.A.: not active

Assessment of the potential benefits of *C. pamphylicum* subsp. *davisii* extracts on inhibition of oxidative stress and enzyme activities, as well as phytochemical contents were presented. This study indicated that methanol extract was primarily observed to be quite effective than water extract with regard to antioxidant, and enzyme inhibition activities. Our phytochemical findings also indicated that chlorogenic acid, catechin, and vanillic acid would be responsible for these bioactivities. These experiments supported that *C. pamphylicum* subsp. *davisii* may be good new source for developing natural agents against several critical diseases related with oxidative stress, and enzymatic mechanisms. Extensive research also needs to be conducted on *C. pamphylicum* subsp. *davisii* to investigate mechanism of biological effects, and further medicinal properties.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

## CONFLICT OF INTEREST

There is no actual, possible, or apparent conflict of interest for this manuscript.

## ETHICS COMMITTEE APPROVAL

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

## REFERENCES

1. Dhanalakshmi, M., Thangadurai, S.A. (2021). Antioxidant and anticancer activities of whole plant extracts of *Lepidagathis pungens* nees: In vitro evaluation. *Pharmacognosy Magazine*, 17(5), 63. [\[CrossRef\]](#)
2. Bhandari, M.R., Jong-Anurakkun, N., Hong, G., Kawabata, J. (2008).  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.). *Food Chemistry*, 106(1), 247-252. [\[CrossRef\]](#)
3. Ayepola, O.R., Brooks, N.L., Oguntibeju, O.O. (2014). Oxidative stress and diabetic complications: the role of antioxidant vitamins and flavonoids. *Antioxidant-Antidiabetic Agents and Human Health*, 923-931. [\[CrossRef\]](#)
4. Fujiwara, M., Yagi, N., Miyazawa, M. (2010). Acetylcholinesterase inhibitory activity of volatile oil from *Peltophorum dasyrachis* Kurz ex Bakar (yellow batai) and Bisabolane-type sesquiterpenoids. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 58(5), 2824-2829. [\[CrossRef\]](#)
5. Jiménez, J., O'Connell, S., Lyons, H., Bradley, B., Hall, M. (2010). Antioxidant, antimicrobial, and tyrosinase inhibition activities of acetone extract of *Ascophyllum nodosum*. *Chemical Papers*, 64(4), 434-442. [\[CrossRef\]](#)
6. Pieroni, A., Quave, C., Villanelli, M. L., Mangino, P., Sabbatini, G., Santini, L., Boccetti, T., Profili, M., Ciccio, T., Rampa, L.G., Antonini, G., Girolamini, C., Cecchi, M., Tomasi, M. (2004). Ethnopharmacognostic survey on the natural ingredients used in folk cosmetics, cosmeceuticals and remedies for healing skin diseases in the inland Marches, Central-Eastern Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(2-3), 331-344. [\[CrossRef\]](#)
7. Sawant, R. L., Lanke, P. D., Wadekar, J. B. (2013). Tyrosinase inhibitory activity, 3D QSAR, and molecular docking study of 2, 5-disubstituted-1, 3, 4-oxadiazoles. *Journal of Chemistry*, 849782. [\[CrossRef\]](#)
8. Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Başer, K.H.C. (2000). In *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (Supplement 2) (Vol. 11). University Press.
9. Alan, S., Kürkçüoğlu, M., Başer, K.H.C. (2011). Composition of Essential Oils of *Calamintha nepeta* (L.) Savi Subsp. *nepeta* and *Calamintha nepeta* (L.) Savi Subsp. *glandulosa* (Req.) P.W. Ball. *Asian Journal of Chemistry*, 23(6), 2357-2360.
10. Alan, S., Kürkçüoğlu, M., Başer, K.H.C. (2011). The composition of the essential oils of *Calamintha pamphylica* subspecies. *Turkish Journal of Biology*, 35(2), 259-265. [\[CrossRef\]](#)
11. Baser, K. H. C., Kirimer, N. (2006). Essential Oils of Lamiaceae Plants of Turkey I International Symposium on the Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilisation, Italy. [\[CrossRef\]](#)

12. Baser, K.H.C., Özek, T., Kürkçüoğlu, M., Tümen, G., Duman, H. (1997). Essential Oils of *Calamintha pamphylica* Boiss. et Heldr. subsp. *Pamphylica* and subsp. *davisii* (Quezel et Contandr.) Davis. *Journal of Essential Oil Research*, 9(3), 371-373. [\[CrossRef\]](#)
13. Alan, S., Ocak, A., Duman, H. (2007). *Calamintha pamphylica* subsp. *alanyense* (Lamiaceae), a new subspecies from South Anatolia, Turkey. *Annales Botanici Fennici*, 44(4), 309-314.
14. Güner, A., Aslan, S. (2012). Türkiye bitkileri listesi:(damarlı bitkiler). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları.
15. Göktürk, R.S. (2015). *Phaselis antik kenti florası I*. *Journal of Interdisciplinary Mediterranean Studies*, 1.
16. Clarke, G., Ting, K.N., Wiart, C., Fry, J. (2013). High correlation of 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, ferric reducing activity potential and total phenolics content indicates redundancy in use of all three assays to screen for antioxidant activity of extracts of plants from the Malaysian rainforest. *Antioxidants*, 2(1), 1-10. [\[CrossRef\]](#)
17. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [\[CrossRef\]](#)
18. Chai, T., Mohan, M., Ong, H., Wong, F. (2014). Antioxidant, iron-chelating and anti-glucosidase activities of *Typha domingensis* Pers (Typhaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(1), 67-72. [\[CrossRef\]](#)
19. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95. [\[CrossRef\]](#)
20. Jeong, S.H., Ryu, Y.B., Curtis-Long, M.J., Ryu, H.W., Baek, Y.S., Kang, J.E., Lee, W.S., Park, K.H. (2009). Tyrosinase inhibitory polyphenols from roots of *Morus lhou*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1195-1203. [\[CrossRef\]](#)
21. Lordan, S., Smyth, T.J., Soler-Vila, A., Stanton, C., Ross, R.P. (2013). The  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food Chemistry*, 141(3), 2170-2176. [\[CrossRef\]](#)
22. Özek, G. (2018). Chemical diversity and biological potential of *Tanacetum praeteritum* subsp. *praeteritum* essential oils. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 5(2), 493-510. [\[CrossRef\]](#)
23. Gonçalves, S., Moreira, E., Grosso, C., Andrade, P.B., Valentão, P., Romano, A. (2017). Phenolic profile, antioxidant activity and enzyme inhibitory activities of extracts from aromatic plants used in Mediterranean diet. *Journal of Food Science and Technology*, 54(1), 219-227. [\[CrossRef\]](#)
24. Araniti, F., Lupini, A., Mercati, F., Statti, G.A., Abenavoli, M.R. (2013). *Calamintha nepeta* L.(Savi) as source of phytotoxic compounds: bio-guided fractionation in identifying biological active molecules. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(6), 1979-1988. [\[CrossRef\]](#)
25. Pacifico, S., Galasso, S., Piccolella, S., Kretschmer, N., Pan, S.P., Marciano, S., Bauer, R., Monaco, P. (2015). Seasonal variation in phenolic composition and antioxidant and anti-inflammatory activities of *Calamintha nepeta* (L.) Savi. *Food Research International*, 69, 121-132. [\[CrossRef\]](#)
26. Kuntal, D., Raman, D., Gokul Sivaraman, R.P.E. (2018). Phytochemical screening for various secondary metabolites, antioxidant, and anthelmintic activity of *Coscinium fenestratum* fruit pulp: A new biosource for novel drug discovery. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(2), 156-165. [\[CrossRef\]](#)
27. Khan, S., Khan, T., Shah, A.J. (2018). Total phenolic and flavonoid contents and antihypertensive effect of the crude extract and fractions of *Calamintha vulgaris*. *Phytomedicine*, 47, 174-183. [\[CrossRef\]](#)
28. Conforti, F., Marrelli, M., Statti, G., Menichini, F., Uzunov, D., Solimene, U., Menichini, F. (2012). Comparative chemical composition and antioxidant activity of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *glandulosa* (Req.) Nyman and *Calamintha grandiflora* (L.) Moench (Labiatae). *Natural Product Research*, 26(1), 91-97. [\[CrossRef\]](#)
29. Ćavar, S., Vidic, D., Maksimović, M. (2013). Volatile constituents, phenolic compounds, and antioxidant activity of *Calamintha glandulosa* (Req.) Benth. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7), 1758-1764. [\[CrossRef\]](#)
30. Popović-Djordjević, J., Cengiz, M., Ozer, M. S., Sarikurku, C. (2019). *Calamintha incana*: essential oil composition and biological activity. *Industrial Crops and Products*, 128, 162-166. [\[CrossRef\]](#)
31. Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Kindl, M., Vladić, J., Lower-Nedza, A.D., Brantner, A.H. (2014). Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the Lamiaceae family. *Molecules*, 19(1), 767-782. [\[CrossRef\]](#)
32. Arantes, S., Piçarra, A., Candeias, F., Teixeira, D., Caldeira, A.T., Martins, M.R. (2017). Antioxidant activity and cholinesterase inhibition studies of four flavouring herbs from Alentejo. *Natural Product Research*, 31(18), 2183-2187. [\[CrossRef\]](#)





# SİPROFLOKSASİN TAYİNİ İÇİN NANOPARTİKÜL TEMELLİ DUYARLI SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

## DEVELOPMENT OF NANOPARTICLE BASED SENSITIVE SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF CIPROFLOXACIN

Hakan BALCI<sup>1,2\*</sup> , Zehra Özden ERDOĞAN<sup>1</sup> , Alperen ÖZDEMİR<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Yüksek İhtisas Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri Programı, 06291, Ankara,  
Türkiye

<sup>2</sup>Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, 60250  
Tokat, Türkiye

### ÖZ

**Amaç:** Siprofloksasin, pek çok bakteriyel enfeksiyon ile savaşta kullanılan bir florokinolon grubu antibiyotiktir. Bu çalışmanın amacı, siprofloksasinin spektrofotometrik tayini için nanopartikül temelli hızlı ve duyarlı bir yöntem geliştirmektir.

**Gereç ve Yöntem:** Yöntem geliştirilmesinde metal nanopartikül olarak AgNP kullanıldı. Siprofloksasinin spektrofotometrik tayininde, AgNP'nin 395.5 nm'deki lokalize yüzey plazmon rezonans (LSPR) absorpsiyon bantı kullanıldı. Deneysel çalışmalarda kullanılan fosfat tampon çözeltisinin optimum pH değerini belirlemek için, farklı pH değerlerindeki siprofloksasin-AgNP'nin absorbans değerindeki değişiklikler incelendi. Dinamik Işın Spektrometresi (DLS) ölçümleri ile AgNP boyutundaki değişiklikler tespit edildi.

**Sonuç ve Tartışma:** Çalışmamızda siprofloksasinin farmasötik preparatlarda tayini için AgNP'ye dayalı yeni bir spektrofotometrik yöntem geliştirildi. Geliştirilen yöntem için doğrusal çalışma aralığı, pH 6.0 fosfat tamponunda 0.003-3.313 mg/L ve pH 8.0 fosfat tamponunda 0.025-2.50 mg/L olarak belirlendi. Oftalmik solüsyondaki siprofloksasin miktarının belirlenmesi için yapılan geri kazanım çalışmasında geri kazanım değeri %87±3.3 olarak bulundu. Bu veriler ışığında, siprofloksasin tayini için geliştirilen AgNP bazlı yöntemin klinik analizlerde etkili bir analiz yöntemi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** AgNP, siprofloksasin, spektrofotometri

\* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Hakan Balcı  
e-posta / e-mail: hbalci88@gmail.com, Tel. / Phone: +905377352071

Gönderilme / Submitted : 11.08.2022

Kabul / Accepted : 26.10.2022

Yayınlanma / Published : 20.01.2023

## ABSTRACT

**Objective:** *Ciprofloxacin is a fluoroquinolone antibiotic used in the fight against many bacterial infections. The aim of this study is to develop a rapid and sensitive method for the spectrophotometric determination of metal nanoparticle-based ciprofloxacin.*

**Material and Method:** *AgNP was used as metal nanoparticle to develop the method. The localized surface plasmon resonance (LSPR) absorption band of AgNP at 395.5 nm was used for the spectrophotometric determination of ciprofloxacin. In order to determine the optimum pH value of the phosphate buffer solution used in the experimental studies, the changes in the absorbance value of ciprofloxacin-AgNP at different pH values were examined. Changes in AgNP size were detected by DLS measurements.*

**Result and Discussion:** *In our study, a new spectrophotometric method based on AgNP was developed for the determination of ciprofloxacin in pharmaceutical preparations. The linear working range for the developed method was determined as 0.003-3.313 mg/L in pH 6.0 phosphate buffer and 0.025-2.50 mg/L in pH 8.0 phosphate buffer. In the recovery study performed to determine the amount of ciprofloxacin in the ophthalmic solution, the recovery value was found to be 87±3.3%. In the light of these data, it is thought that the AgNP-based method developed for the determination of ciprofloxacin can be used as an effective analysis method in clinical analysis.*

**Keywords:** *AgNPs, ciprofloxacin, spectrophotometry*

## GİRİŞ

İkinci nesil florokinolon grubu bir antibiyotik olan siprofloksasin (kimyasal adı; 1-siklopropil-6-floro-4-okso-7-(piperazin-1-yl)-1.4-dihidrokinolin-3-karboksilik asit) güçlü antimikrobiyal aktivite ve önemli farmakokinetik özellikler sergiler. Üst ve alt solunum yolu enfeksiyonları, bazı deri, kemik, yumuşak doku enfeksiyonları ve pnömoni dahil olmak üzere çeşitli bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için klinik uygulamalarda son otuz yıldır iyi bir etkinlik gösterdiği bilinmektedir [1]. Siprofloksasin Dünya Sağlık Örgütü tarafından tüberküloz (TB) tedavisinde kullanılan birinci basamak anti-TB tedavisine direnç veya intolerans gelişen vakalarda ikinci basamak ilaç olarak önerilmiştir [2].

Ağırlıklı olarak Gram pozitif ve Gram negatif organizmaların neden olduğu bakteriyel enfeksiyonlar küresel olarak önemli bir sağlık tehdidini işaret etmektedir ve hastane kaynaklı enfeksiyonların çoğundan sorumludur, bu da geniş ölüm oranlarına ve küresel sağlık sistemleri üzerinde yüke neden olmaktadır [3,4]. İlave olarak farklı direnç seviyelerine sahip antibiyotiklere dirençli patojenlerin ortaya çıkması mortalitedeki önemli artışla ilişkilendirilmektedir [5]. Günümüzde de bu tür patojenlerin dünya genelinde yaygın olduğu klinik bulgular görülmekte ve bu patojenlerle mücadelede kullanılan siprofloksasinin de etkisinin doza bağlı olduğu bildirilmektedir [6]. Dolayısıyla bu enfeksiyonlara karşı verilen mücadelede kullanılan siprofloksasin dozunun özellikle plazma düzeyinin belirlenmesi hem ilaç dozunun terapötik aralıkta kalmasını yani hastalığın kontrol altında tutulabilmesini kolaylaştıracak hem de ilacın yan etki profilini azaltmamıza sebep verecek ve bakteriler tarafından sentezlenen  $\beta$ -laktamlara karşı direnç gelişmesinin önüne geçilmesine olanak sağlayacaktır.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde pek çok antibiyotik için (sefalosporinler, ampicilin-sulbaktam kombinasyonu gibi beta laktam-beta laktamaz antibiyotikler) uygun spektrofotometrik yöntemin belirlendiği ve bu yöntem doğrultusunda belirtilen ilaçların çeşitli numunelerde tayininin yapıldığı görülmektedir [7,8]. Çalışmamızda kullandığımız ve klinik olarak kullanım alanı da oldukça geniş olan siprofloksasin tayini için de literatürde çeşitli yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Siprofloksasin tayininde HPLC [9, 10], kapiler elektroforez [11], akış enjeksiyon analizi [10], LC-MS [12], elektrokimyasal analiz [13,14] ve ayrıca UV-Spektrofotometri yöntemlerinin kullanıldığı bildirilmiştir [15,16]. Ancak literatürdeki mevcut çalışmalarda düşük derişimlerde ve nanopartiküller bazda siprofloksasin tayininin yapıldığına dair bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bir kantitatif analiz yöntemi olan spektrofotometri, farmasötik analizlerde hala en sık kullanılan yöntemdir; diğer yöntemlere göre daha hızlı ve önemli ekonomik avantajlar sağlamaktadır [17]. Spektrofotometrik analizlerde metal nanopartiküllerin kullanımı; sahip oldukları yüzey plazmon özelliğinden dolayı daha duyarlı analiz yapılmasına olanak sağlar. Yüzey plazmon rezonans (SPR);

enerji taşıyan ışık fotonu ile metal yüzeyinin elektronlarının birleşmesine ya da ışık fotonu ile metal yüzey arasındaki enerji transferine dayanmaktadır. Birleşmenin ve/veya enerji transferinin gerçekleştiği ışık geliş açısı, metal yüzeyine ve çevresine göre değişiklik gösterir. Işık fotonları ile metal yüzeyi arasında bir eşleşme ve/veya rezonans yakalandığında enerji transferi gerçekleşir [18]. SPR de ışık fotonu ve metal yüzey arasındaki etkileşimler sonucu oluşan yüzey rezonans dalgaları kullanılır. Yüzey rezonans dalgaları metallerin yüzeylerinde oluşur ve serbest elektron plazmaları gibi davranırlar [19]. SPR’de kullanılacak metal uygun ışıkla eşleşme ya da rezonansa girebilecek iletken bant elektronlarına sahip olmalı ve sensör uygulamalarında kullanılan gerekli modifikasyonlar için uygun özellikte olmalıdır [20]. Bu özellikleri sağlayan birçok metal arasında gümüş en yaygın kullanılanıdır. Metal yüzeylerin SPR özellikleri kullanılarak düşük miktarlarda tayin yapılabilecek yöntemler geliştirilebilir.

Bu çalışmanın amacı; UV spektrofotometri yöntemi kullanarak siprofloksasinin tayinini gerçekleştirmek ve bu tayin işleminde kliniği yansıması açısından daha düşük derişimlere inebilmek için metal nanopartikülün (AgNP) yüzey plazmon özelliklerinden faydalanarak tayin işlemleri yapmaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Cihaz ve Kimyasallar

Siprofloksasin ve gümüş nanopartikül (AgNP, 20 nm) Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) diğer kimyasallar ise Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD) ve Tekkim'den (İstanbul, Türkiye) temin edildi. Spektrofotometrik analizler RAYLEIGH UV 1601 UV-Vis spektrofotometresi (Pekin, Çin) ile gerçekleştirildi. Çözeltilerin pH değerlerini ölçmek için Ohaus Starter 2100 pH metre ve kombine pH elektrodu kullanıldı. Tüm sulu çözeltiler Microtest saflaştırma sisteminden elde edilen distile su ile günlük olarak hazırlandı. Dinamik Işın Spektrometresi (DLS) ölçümleri Ortadoğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarında (Ankara, Türkiye) yapıldı.

### Standart ve Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması

37.0 mg siprofloksasin 10 ml’lik kalibre edilmiş balon jodede distile su içinde çözülerek standart stok solüsyonu hazırlandı. 0.004-3.85 mg/l konsantrasyon aralığında siprofloksasin kalibrasyon çözeltileri standart stok çözeltinin seyreltilmesi ile elde edildi.

### Siprofloksasinin Spektrofotometrik Tayin Prosedürü

Distile su ile çözündürülerek hazırlanan stok siprofloksasin çözeltisinin (3315.0 mg/l) 0.1 M fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile seyreltilmesiyle farklı konsantrasyonlarda siprofloksasin çözeltileri hazırlandı. Standart AgNP (20 mg/l) çözeltisi de 1:10 oranında 0.1 M fosfat tampon çözeltisi ile seyreltildi. Nanopartikül ve siprofloksasin çözeltisi kullanılarak hazırlanan karışım çözeltileri kuvars küvete alınarak 200.0-500.0 nm dalga boyu aralığında UV-Vis spektrumları kaydedildi. Siprofloksasin tayini,  $Abs_{Sip_{272.5nm}}/Abs_{AgNP_{395.5nm}}$  absorbans oranı ile gerçekleştirildi. Tüm spektrofotometrik ölçümler oda sıcaklığında üç tekrar halinde alındı.

### Farmasötik Preparasyon

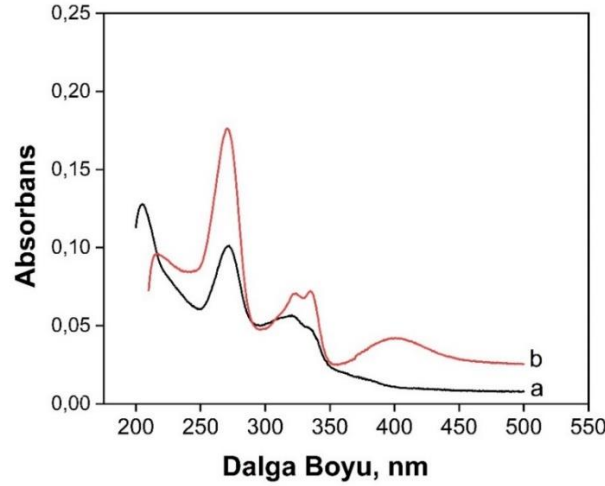
3.5 mg/ml siprofloksasin içeren ticari bir oftalmik çözeltisi (Bilim İlaç San. Ve Tic. A.Ş., İstanbul, Türkiye tarafından üretilen Siprogut® ilacı) analiz edildi.

## SONUÇ VE TARTIŞMA

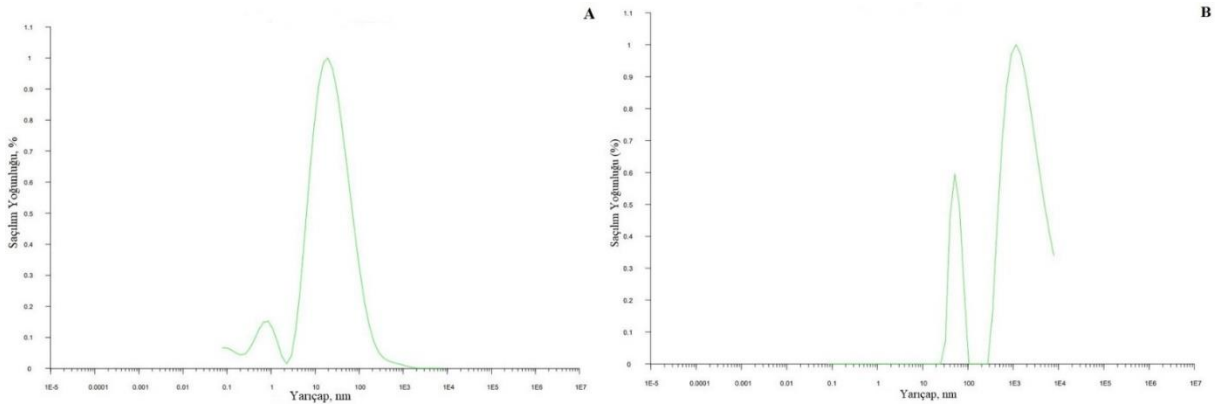
Siprofloksasinin spektrofotometrik tayini, AgNP’nin 395.5 nm dalga boyundaki rezonans absorbans değeri kullanılarak gerçekleştirildi. Nanopartiküllerin spektrofotometrik çalışmalarda kullanılması daha hassas ve düşük konsantrasyon analizlerine olanak sağlar. Geliştirilen yöntemde AgNP kullanılarak  $Abs_{Sip}/Abs_{AgNP}$  değerindeki değişimler incelenerek siprofloksasin analizi yapıldı (Şekil 1).

AgNP dayalı siprofloksasin tayininde, nanopartiküllerin agregasyon özelliğinden yararlanıldı. Siprofloksasin ile etkileşimden sonra nanopartiküllerdeki değişiklikleri değerlendirmek için Dinamik

Işın Spektrometresi (DLS) ölçümlerinden yararlanıldı (Şekil 2). DLS ölçümleri incelendiğinde, siprofloksasin eklenmesinden sonra AgNP'lerin hidrodinamik boyutunun 20.0 nm'den 1000.0 nm'ye yükseldiği gözlemlendi (Şekil 2A-2B). Hidrodinamik boyuttaki artış AgNP çözeltisine siprofloksasin eklenmesiyle karakteristik parçacık agregasyonunun meydana geldiğini göstermektedir.



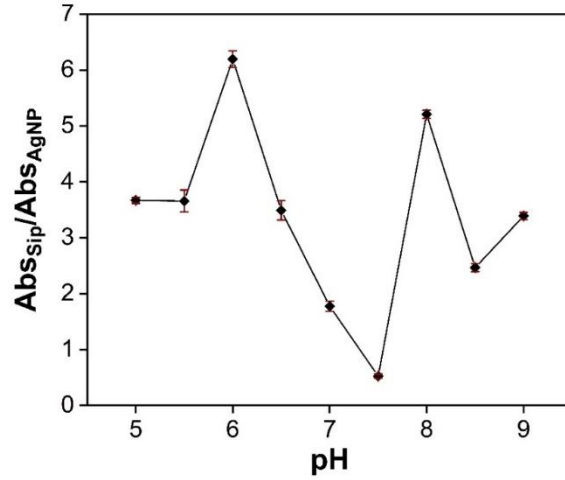
**Şekil 1.** A) Siprofloksasin çözeltisinin spektrofotometrik yanıtı, B) AgNP-Siprofloksasin çözeltisinin spektrofotometrik yanıtı ([AgNP]: 10.79 mg/l, [Sip]: 3.31 mg/l  $\mu$ M)



**Şekil 2.** A) AgNP'nin DLS sonuçları, B) AgNP-siprofloksasin DLS sonuçları

### Deneysel Şartların Optimizasyonu

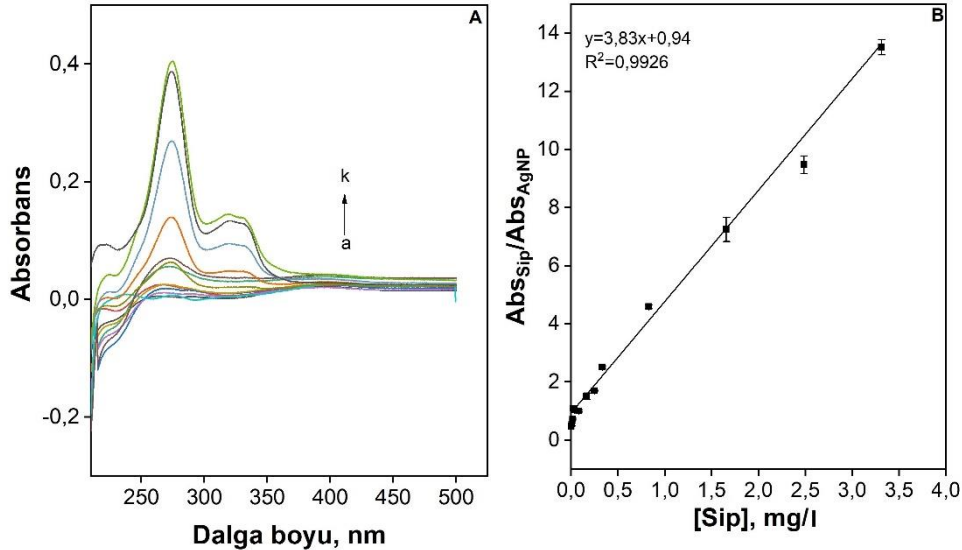
Metal nanopartiküllere dayalı spektrofotometrik analizler çalışma ortamının pH'sından etkilenir. Bu nedenle optimum çalışma pH'sının belirlenmesi son derece önemlidir. Bu nedenle AgNP kullanılarak yapılan spektrofotometrik analizde en iyi absorbans oranını bulmak için farklı pH değerleri 3.31 mg/l siprofloksasin varlığında optimize edildi. Absorbans oranının (AbsSip/AbsAgNP) pH bağımlılığı 5.0-9.0 pH aralığında test edildi (Şekil 3). AgNP'lere dayalı analizde maksimum absorbans oranı pH 6.0 ve pH 8.0'de elde edilmiştir. AgNP'nin çevre koşullarında agregasyonu ve çözünmesi üzerine pH'ın etkisi hakkında fazla literatür bilgisi olmamasına rağmen gözlemlenen çevresel koşullar AgNP'ler için pH 5.0-8.0'dir [21]. Bu durum göz önüne alındığında optimum pH değeri (6.0 ve 8.0) AgNP'lere dayalı analiz için uygundur.



Şekil 3. AgNP'ye dayalı siprofloksasin analizinde optimum pH değerlerinin belirlenmesi

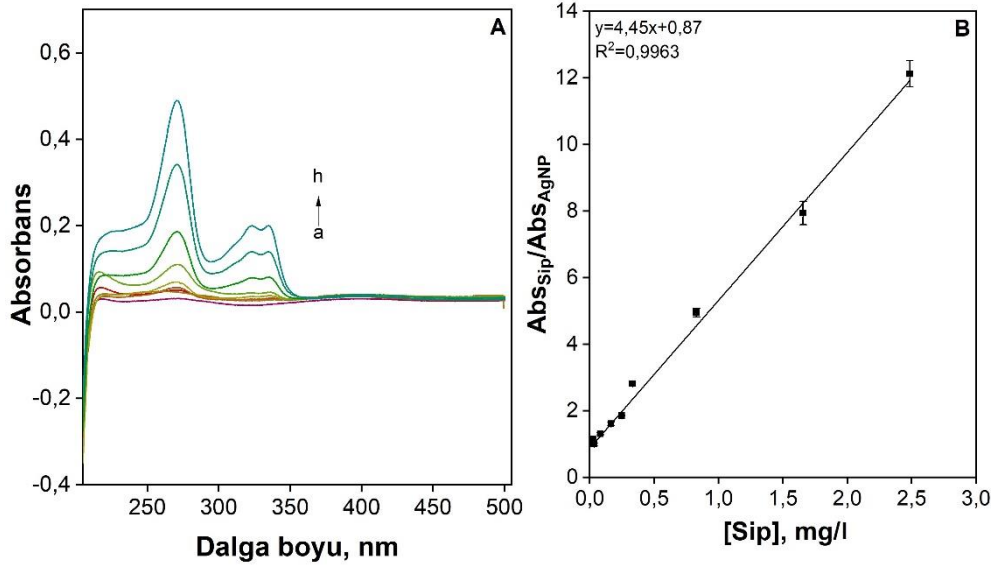
### Performans Parametreleri

AgNP'ye dayalı spektrofotometrik yöntem ile siprofloksasin tayini 0.1 M pH 6.0 fosfat tamponu sabit bir AgNP konsantrasyonu ve farklı konsantrasyonlarda siprofloksasin karışımlarının absorban değerleri ölçülerek gerçekleştirildi. AgNP'ye dayalı yöntem pH 6.0'da 0.003-3.313 mg/l siprofloksasin derişim aralığında doğrusal bir yanıt gösterdi (Şekil 4). AgNP'ye dayalı yöntem için gözlenebilir sınıırı (LOD) 0.003 mg/l olarak hesaplandı (LOD=3.3sb/m, burada sb, farklı 0.003 mg/l siprofloksasin çözeltilerinden gelen yanıtların standart sapmasıdır ve m, kalibrasyon eğrisinin eğimidir). Metal nanopartiküle dayalı yöntemin LOD'si daha önce bildirilen spektrofotometrik çalışmalardan daha düşüktür [22-24].



Şekil 4. A) UV absorpsiyon spektrumu ve B) AgNP dayalı spektrofotometrik yöntemin kalibrasyon grafiği (a-k: 0.003-3.313 mg/l, pH 6.0 Fosfat tamponu)

AgNP'ye dayalı spektrofotometrik yöntem ile siprofloksasin tayini 0.1 M pH 8.0 fosfat tamponu sabit bir AgNP konsantrasyonu ve farklı konsantrasyonlarda siprofloksasin karışımlarının absorbans değerleri ölçülerek incelendi. AgNP'ye dayalı yöntem pH 8.0'de 0.025-2.50 mg/l'lık siprofloksasin derişim aralığında doğrusal bir yanıt meydana getirdi (Şekil 5). AgNP'ye dayalı yöntem için gözlenebilir sınırlar (LOD) 0.006 mg/l olarak hesaplandı ( $LOD=3.3sb/m$ , burada sb, farklı 0.025 mg/l siprofloksasin çözeltilerinden gelen yanıtların standart sapmasıdır ve m, kalibrasyon eğrisinin eğimidir). Metal nanopartiküle dayalı yöntemin LOD'si daha önce bildirilen spektrofotometrik çalışmalardan daha düşüktür [22-24].



**Şekil 5.** A) UV absorpsiyon spektrumu ve B) AgNP dayalı spektrofotometrik yöntemin kalibrasyon grafiği (a-h: 0.025-2.50 mg/l, pH 8.0 Fosfat tamponu)

Geliştirilen AgNP temelli spektrofotometrik yöntemin performans değerlendirmesi, siprofloksasin tayini için literatürde rapor edilen çeşitli yöntemlerle elde edilen sonuçların karşılaştırılması ile gerçekleştirildi. Tablo 1'deki sonuçlar, geliştirilen yöntemin bildirilen diğer yöntemlerle daha iyi ve/veya karşılaştırılabilir olduğunu göstermektedir.

**Tablo 1.** Siprofloksasin tayini için literatürde rapor edilen çeşitli yöntemlerin performans özelliklerinin geliştirilen AgNP temelli spektrofotometrik yöntem ile karşılaştırılması

Probe	Tayin Yöntemi	Doğrusal Çalışma Aralığı (mg/l)	LOD (mg/l)	Ref.
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /GO-COOH nanokompozit	Spektrofotometri	0.03-1.5	0.005	[22]
Fe <sup>3+</sup> -GR çözeltisi	Spektrofotometri	0.5-50	0.2	[23]
Fe <sup>3+</sup>	Spektrofotometri	2.5-120	2.5	[24]
b-CD/MWCNT	Elektrokimya	3.31-26.51	0.017	[25]
AIS QDs	Floresans	1.0-19.5	0.12	[26]
RFFS/GMPA@CdTe-QDs	Floresans	0-0.015	0.300	[27]
AgNP	Spektrofotometri	0.003-3.313 (pH 6.0) 0.025-2.50 (pH 8.0)	0.003 0.006	Bu çalışma

## Analitık Uygulanabilirlik

AgNP dayalı spektrofotometrik yöntemin analitik uygulanabilirliği, oftalmik solüsyonda siprofloksasinin absorbans oranları kullanarak (AbsSip/AbsAgNP) kantitatif tayini yapılarak araştırıldı. Ticari oftalmik solüsyonu için siprofloksasin miktarı 3.00 mg/ml idi. 1/1000 oranında seyreltilmiş ticari numune spektrofotometrik analizlerde kullanıldı. Hazırlanan bu numune çözeltisi kullanılarak siprofloksasin miktarı doğrudan kalibrasyon yöntemiyle ve geri kazanım değeri hesaplandı. Numune analizi sonucunda elde edilen sonuçlar Tablo 2’de gösterildi. Geri kazanım değerlerinin %83.33-%90.0 aralığında olması AgNP’ye dayalı olarak geliştirilen yöntemin farmasötik preparatlarda siprofloksasin tayininde başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

**Tablo 2.** Geliştirilen AgNP temelli spektrofotometrik yöntem kullanılarak ilaç numunesinde doğrudan kalibrasyon yöntemi ile elde edilen geri kazanım sonuçları

Sip miktarı, mg/ml	Bulunan, mg/ml	% Geri Kazanım
3.0	2.6	86.67
3.0	2.5	83.33
3.0	2.7	90.00
	2.6±0.1	86.67±3.3

Bu çalışmada siprofloksasin analizi için plazmonik nanopartikül olarak bilinen AgNP kullanarak yeni bir spektrofotometrik yöntem geliştirildi. AgNP, rezonans absorbans bantları sayesinde düşük konsantrasyonlarda siprofloksasin tayinine olanak sağladı. Geliştirilen yöntem geniş bir çalışma aralığı ve düşük gözlenebilirlik sınırı gösterdi. AgNP dayalı spektrofotometrik yöntem için doğrusal denklem pH 6.0 ve 8.0’de sırasıyla  $Abs_{\text{oran}} = 1.25[\text{Sip}] + 0.84$  ( $R^2 = 0.9926$ ) ve  $Abs_{\text{oran}} = 1.47[\text{Sip}] + 0.97$  ( $R^2 = 0.9960$ ) olarak bulundu. Geliştirilen nanopartikül bazlı spektrofotometrik yöntemin analitik kullanılabilirliği ticari oftalmik solüsyondaki siprofloksasin tayini ile ortaya kondu ve kazanım değeri %87±3.3 olarak bulundu. Plazmonik nanopartiküle dayalı geliştirilen yöntemin siprofloksasin tayininde iyi performans sergilemesi nedeniyle rutin analizlerde kullanılması öngörülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı kapsamında desteklenmiştir.

## YAZAR KATKILARI

Kavram: H.B., Z.Ö.E.; Tasarım: H.B., Z.Ö.E.; Denetim: H.B., Z.Ö.E.; Kaynaklar: H.B., Z.Ö.E., A.Ö.; Malzemeler: H.B., Z.Ö.E., A.Ö.; Veri Toplama ve/veya İşleme: H.B., Z.Ö.E., A.Ö.; Analiz ve/veya Yorumlama: H.B., Z.Ö.E., A.Ö.; Literatür Taraması: H.B., Z.Ö.E.; Makalenin Yazılması: H.B., Z.Ö.E.; Kritik İnceleme: H.B., Z.Ö.E.; Diğer: -

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

## ETİK KURUL ONAYI

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

## KAYNAKLAR

- Verderosa, A.D., de la Fuente-Núñez, C., Mansour, S.C., Cao, J., Lu, T.K., Hancock, R.E., Fairfull-Smith, K.E. (2017). Ciprofloxacin-nitroxide hybrids with potential for biofilm control. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 138, 590-601. [\[CrossRef\]](#)



2. Nahid, P., Mase, S.R., Migliori, G.B., Sotgiu, G., Bothamley, G.H., Brozek, J.L., Cattamanchi, A., Cegielski, J.P., Chen, L., Daley, C.L., Dalton, T.L., Duarte, R., Fregonese, F., Horsburgh, C.R., Jr, Ahmad Khan, F., Kheir, F., Lan, Z., Lardizabal, A., Lauzardo, M., Mangan, J.M., Seaworth, B. (2019). Treatment of drug-resistant Tuberculosis. An official ATS/CDC/ERS/IDSA clinical practice guideline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 200(10), e93-e142. [\[CrossRef\]](#)
3. Hu, Y.Q., Zhang, S., Xu, Z., Lv, Z.S., Liu, M.L., Feng, L.S. (2017). 4-Quinolone hybrids and their antibacterial activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 141, 335-345. [\[CrossRef\]](#)
4. Weinstein, R.A., Gaynes, R., Edwards, J.R. (2005). Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *clinical infectious diseases*. National Nosocomial Infections Surveillance System, 41(6), 848-854. [\[CrossRef\]](#)
5. Tay, S.B., Yew, W.S. (2013). Development of quorum-based anti-virulence therapeutics targeting gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 16570-16599. [\[CrossRef\]](#)
6. Zhang, G.F., Liu, X., Zhang, S., Pan, B., Liu, M.L. (2018). Ciprofloxacin derivatives and their antibacterial activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 146, 599-612. [\[CrossRef\]](#)
7. Mahgoub, H., Aly, F.A. (1998). UV-spectrophotometric determination of ampicillin sodium and sulbactam sodium in two-component mixtures. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17(8), 1273-1278. [\[CrossRef\]](#)
8. Shahrouei, F., Elhami, S., Tahanpesar, E. (2018). Highly sensitive detection of ceftriaxone in water, food, pharmaceutical and biological samples based on gold nanoparticles in aqueous and micellar media. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 203, 287-293. [\[CrossRef\]](#)
9. Wu, S.S., Chein, C.Y., Wen, Y.H. (2008). Analysis of ciprofloxacin by a simple high-performance liquid chromatography method. *Journal of Chromatographic Science*, 46(6), 490-495. [\[CrossRef\]](#)
10. Al-Momani, I., Haj-Hussein, A., Tahtamouni, A. (2008). Flow Injection Spectrophotometric and chromatographic determination of ciprofloxacin and norfloxacin in pharmaceutical formulations original paper. *Journal of Flow Injection Analysis*, 25(2), 151. [\[CrossRef\]](#)
11. Fierens, C., Hillaert, S., Van den Bossche, W. (2000). The qualitative and quantitative determination of quinolones of first and second generation by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 22(5), 763-772. [\[CrossRef\]](#)
12. Tong, L., Li, P., Wang, Y., Zhu, K. (2009). Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere*, 74(8), 1090-1097. [\[CrossRef\]](#)
13. Fotouhi, L., Alahyari, M. (2010). Electrochemical behavior and analytical application of ciprofloxacin using a multi-walled nanotube composite film-glassy carbon electrode. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(1), 110-114. [\[CrossRef\]](#)
14. Gayen, P., Chaplin, B.P. (2016). Selective electrochemical detection of ciprofloxacin with a porous nafion/multiwalled carbon nanotube composite film electrode. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(3), 1615-1626. [\[CrossRef\]](#)
15. Dermiş, S., Kılıç, S., Ertekin, Z.C., Dinç, E. (2019). Quantitative analysis of ciprofloxacin in an ophthalmic solution using UV absorption spectrophotometry and derivative spectrophotometry. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 14(1), 71-76. [\[CrossRef\]](#)
16. Zhou, Z., Jiang, J.Q. (2012). Detection of ibuprofen and ciprofloxacin by solid-phase extraction and UV/Vis spectroscopy. *Journal of Applied Spectroscopy*, 79(3), 459-464. [\[CrossRef\]](#)
17. Talsky, V.G. (1994). Derivative spectrophotometry. Low and higher order. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 228. [\[CrossRef\]](#)
18. Caktü Güler, K. (2014). Ph.D. Thesis. Preparation of surface plasmon resonance based biosensors diclofenac imprinted. Department of Nanotechnology and Nanomedicine, Institute of Science and Technology, Hacettepe University, Ankara, Turkey.
19. Homola, J., Yee S.S., Myszka D. (2008). Surface plasmon biosensors, in optical biosensors: Today and tomorrow (2nd Edition). In: F.S. Ligler and C.R. Taitt (Eds.), *Optical Biosensors*, (pp. 185-242). Elsevier.
20. Dibekkaya, H. (2015). Master Thesis. Preparation of surface plasmon resonance based biosensor for determination of AntiCCP antibodies. Department of Bioengineering, Institute of Science and Technology, Hacettepe University, Ankara, Turkey.
21. Fernando, I., Zhou, Y. (2019). Impact of pH on the stability, dissolution and aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Chemosphere*, 216, 297-305. [\[CrossRef\]](#)
22. Taghizade, M., Ebrahimi, M., Fooladi, E., Yoosefian, M. (2021). Simultaneous spectrophotometric determination of the residual of ciprofloxacin, famotidine, and tramadol using magnetic solid phase extraction coupled with multivariate calibration methods. *Microchemical Journal*, 160, 105627. [\[CrossRef\]](#)



23. Palamy, S., Ruengsitagoon, W. (2018). Reverse flow injection spectrophotometric determination of ciprofloxacin in pharmaceuticals using iron from soil as a green reagent. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 190, 129-134. [\[CrossRef\]](#)
24. Al-Ameer Khammas, Z.A., Mubdir, N.S. (2014). An eco-friendly method for extraction and determination of ciprofloxacin in blood serum and pharmaceuticals. *Science Journal of Analytical Chemistry*, 2, 47-54. [\[CrossRef\]](#)
25. Garrido, J.M., Melle-Franco, M., Strutyński, K., Borges, F., Brett, C.M., Garrido, E.M. (2017).  $\beta$ -Cyclodextrin carbon nanotube-enhanced sensor for ciprofloxacin detection. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering*, 52(4), 313-319. [\[CrossRef\]](#)
26. Yang, B., Zhang, Y., Zhang, Q., Liu, Y., Yan, Y. (2019). Study on the preparation of water-soluble AgInS<sub>2</sub> quantum dots and their application in the detection of ciprofloxacin. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 30(20), 18794-18801. [\[CrossRef\]](#)
27. Yuan, X.L., Wu, X.Y., He, M., Lai, J.P., Sun, H. (2022). A ratiometric fiber optic sensor based on CdTe QDs functionalized with glutathione and mercaptopropionic acid for on-site monitoring of antibiotic ciprofloxacin in aquaculture water. *Nanomaterials*, 12(5), 829. [\[CrossRef\]](#)



## GENETIC DIVERSITY OF *ACINETOBACTER BAUMANNII* STRAINS ISOLATED FROM DIFFERENT HOSPITALS

### FARKLI HASTANELERDEN İZOLE EDİLEN *ACINETOBACTER BAUMANNII* SUŞLARININ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİ

Hilal Basak EROL<sup>1\*</sup> , Banu KASKATEPE<sup>1</sup> , Nurten ALTANLAR<sup>1</sup> ,  
Sulhiye YILDIZ<sup>2</sup> , Suleyman YALCIN<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Microbiology, Ankara University Faculty of Pharmacy,  
Ankara, Turkey

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Microbiology, Lokman Hekim University Faculty of  
Pharmacy, Ankara, Turkey

<sup>3</sup>Department of Microbiology Reference Laboratory and Biological Product, MoH  
General Directorate of Public Health, Ankara, Turkey

#### ABSTRACT

**Objective:** *The genotypic analysis of the strains can provide information to evaluate the genetic relationships among strains and epidemiological investigations, and it is crucial for monitoring their circulation in different geographic regions. This study was to aim to identify genetic similarities or dissimilarities among clinical Acinetobacter baumannii (A. baumannii) isolates from four different hospitals.*

**Material and Method:** *In this study, 78 non-duplicate clinical isolates of A. baumannii were received from patients in the critical care units. The colistin MIC values of 24 A. baumannii strains randomly selected from four different hospitals and known to have antibiotic susceptibility were determined. These strains were genetically characterized by the Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR method.*

**Result and Discussion:** *The results of the study showed that the isolates were divided into 2 clusters (A1 and A2) and Cluster A2 was represented by a single genotype (C1) and 23 interrelated genotypes were in Cluster A1.*

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii, ERIC-PCR, genetic diversity, resistance*

\* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Hilal Basak Erol  
**e-mail / e-posta:** hcuhadaroglu@ankara.edu.tr, **Phone / Tel.:** +903212033187

## ÖZ

**Amaç:** Suşların genotipik analizi, suşlar arasındaki genetik ilişkileri ve epidemiyolojik araştırmaları değerlendirmek için bilgi sağlayabilir ve farklı coğrafi bölgelerdeki dolaşımının izlenmesi için önemlidir. Bu çalışma, dört farklı hastaneden elde edilen klinik *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) izolatları arasındaki genetik benzerlik veya farklılıkları belirlemeyi amaçlamıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada, yoğun bakım ünitelerindeki hastalardan 78 *A. baumannii* klinik izolatu alınmıştır. Dört farklı hastaneden rastgele seçilen ve antibiyotik duyarlılığı bilinen 24 *A. baumannii* suşunun kolistin MİK değeri belirlenmiştir. Bu suşlar, Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR yöntemi ile genetik olarak karakterize edilmiştir.

**Sonuç ve Tartışma:** Çalışmanın sonucunda, izolatların 2 kümeye (A1 ve A2) ayrıldığı ve Küme A2'nin tek bir genotip (C1) ile temsil edildiği ve birbiriyle ilişkili 23 genotipin Küme A1'de olduğunu gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Acinetobacter baumannii*, direnç, ERIC-PCR, genetik çeşitlilik

## INTRODUCTION

*A. baumannii* is an opportunistic pathogen that causes a wide range of serious nosocomial infections such as urinary tract infections, ventilator-associated pneumonia, and bloodstream infections [1]. The natural resistance of *A. baumannii* to dryness and disinfectants and the acquisition of a wide variety of resistance mechanisms through the gain of genetic elements such as plasmids, integrons, and transposons ensure its long-term survival in the environment, making it difficult to eradicate from the clinical environment and fight infection [2]. In recent years, multidrug-resistant strains of *A. baumannii* have spread worldwide. These resistant strains cause long hospital stays, increased costs, and high mortality rates. In addition, the emergence of pan-resistant species has become a serious clinical problem. Because a limited number of antibiotics are effective for such strains. *A. baumannii* is resistant to many antibacterial agents, with the inclusion of carbapenems and sometimes colistin, in most cases, optimal treatment is not available for nosocomial infections caused by this microorganism. Therefore, a great deal of research has been done recently to elucidate the characteristics of *Acinetobacter* infection, including nosocomial transmission, infection risk factors, drug-resistant strains, and effective treatments [3, 4]. In addition, the virulence characteristics and pathogenic potential of *A. baumannii* are often not fully elucidated. With the expansion of the *A. baumannii* sequence database over time, the development of a large array phylogenomic and phenotypic analyzes that provide insights into its evolution and adaptation as a human pathogen has therefore become important [5, 6].

Genotypic techniques using specific molecular markers are widely used for typing *Acinetobacter* species. These techniques are Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Randomly amplified polymorphic DNA analysis (RAPD), Arbitrarily PCR (APPCR), Repetitive extragenic palindromic PCR (REP-PCR), Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR (ERIC-PCR) and Pulse-field gel electrophoresis (PFGE) [7]. *A. baumannii* has sequences of repeats called symmetrical elements are present and are usually found in the non-coding part of the DNA. Enterobacterial recurrent intergenic consensus (ERIC)-PCR-based genotyping models can be particularly helpful to determine the circulation of epidemic clones and are used to differentiate bacterial types by conserved and repeated sequences in bacteria or some fungi. Compared to other methods, polymerase chain reaction (PCR)-based fingerprinting methods are easier and more cost-effective to implement [8]. In this study, 24 out of 78 *A. baumannii* isolates from four different hospitals were used to analyze the genetic variation using the ERIC-PCR method.

## MATERIAL AND METHOD

### Strain Collection

A total of 78 non-duplicate clinical isolates of *A. baumannii* were isolated from the samples received from patients in the critical care units (intensive care, burns, post-operative areas) of four different hospitals (Ankara Numune Training and Research Hospital Medical Microbiology Laboratory,

Ankara University Ibni Sina Hospital Central Microbiology Laboratory, Ankara University Cebeci Hospital Central Microbiology Laboratory, Dr. Sami Ulus Gynecology, Obstetrics and Child Health and Diseases Training and Research Hospital Microbiology Laboratories), Ankara, Turkey between July 2018 and June 2019. The isolates were collected from respiratory secretions sputum, pleural fluid, urine, wound, and blood. *A. baumannii* was identified in the clinical microbiology laboratory by standard biochemical tests as well as the Vitek 2 system (bioMérieux). Culture confirmation was done using MALDI-TOF MS (Bruker, ABD). The study was approved by the Ankara University Faculty of Medicine Clinical Research Ethics Committee. Antibiotic susceptibilities were determined by the standard disc diffusion method and interpreted according to the guidelines of the EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) [9]. The colistin MIC (Minimal Inhibition Concentration) values of the strains were determined by the broth microdilution method with the recommendations of EUCAST 2020-01-01 [10].

### Isolation of Bacterial DNA

The bacterial genomic DNA was prepared by using the lysis buffer (4 M Guanidium HCl, 1% Triton X-100, 25 mM Sodium citrate pH 7, 100 mM B-Mercaptoethanol). Briefly, colonies grown in fresh cultures of strains were collected with loops, suspended in a liquid medium, and incubated overnight at 37°C.

The concentrations of the fresh bacterial suspensions prepared were adjusted to be similar in the spectrophotometer. Then, the bacterial suspensions were centrifuged at 10000 rpm in an Eppendorf tube and the supernatant was discarded. Lysis buffer was added to the precipitate, then centrifuged and treated with phenol-chloroform-alcohol.

### Molecular Typing by ERIC-PCR Analysis

Molecular typing of randomly selecting 24 *A. baumannii* strains from four hospitals was performed by using the ERIC-PCR method [11]. For this purpose, the DNAs of all bacteria were obtained and quantified spectrophotometrically. Optimization studies were carried out to obtain suitable band profiles in PCR. Firstly, different primer annealing temperatures were tested. Afterwards, it was tried to increase the number of bands and move away from the smear image by increasing the primer concentrations and changing the Mg<sup>++</sup> concentration by 1-7 mM. All strains were performed simultaneously after PCR optimization. The primer sequences, PCR mix, and temperature cycle used in the ERIC-PCR reaction were given in Table 1. After the reaction, amplicons were run on a 1.6% agarose gel at 65 volts for approximately 2 hours. The gel was then stained with ethidium bromide solution and recorded by photographing the bands under UV light on the VersaDoc (Bio-Rad) imaging system.

**Table 1.** Primer sequences, PCR mix, and temperature cycling were used in the ERIC-PCR reaction.

Primers	
ERIC 1	5' ATGT AAG CTC CTG GGG ATT CAC 3'
ERIC 2	5' AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G 3'
PCR Mix	
dNTP (dA+dT+dG+dC)	0.2 mM
Primer 1: ERIC1	0.8 µM
Primer 2: ERIC2	0.8 µM
MgCl <sub>2</sub>	4.5 mM

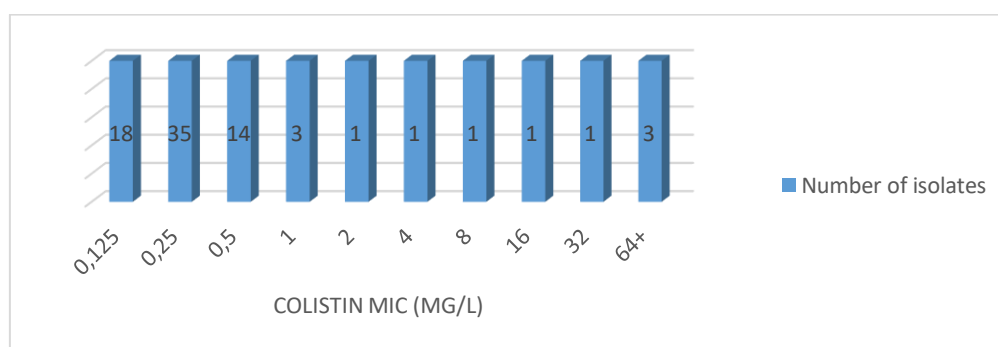
**Table 1 (continue).** Primer sequences, PCR mix, and temperature cycling were used in the ERIC-PCR reaction.

PCR Mix			
DreamTaq Buffer	1x		
DreamTaq	0.5 u		
Template DNA	100 ng		
H <sub>2</sub> O			
Temperature cycle	Temperature (°C)	Time (second)	Cycles
Initial denaturation	94	120	1
Denaturation	94	15	40
Annealing	52	30	
Extension	72	120	
Final extension	72	300	1

## RESULT AND DISCUSSION

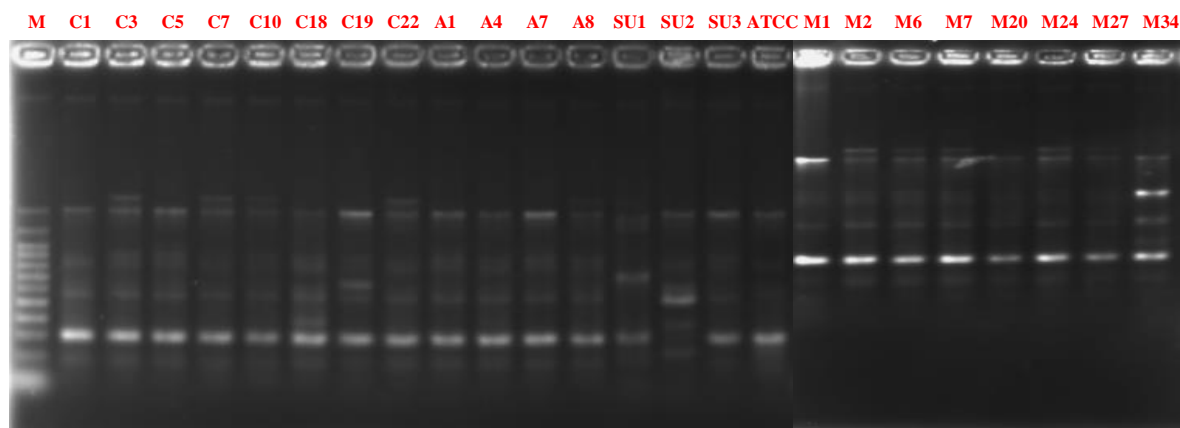
### Bacterial Isolates and Antimicrobial Susceptibility Pattern

*A. baumannii* causes important hospital infections, especially in intensive care units [12]. Long hospitalization period, stay in the intensive care unit, parenteral nutrition, invasive interventions, mechanical ventilation, and device use (permanent catheter, endotracheal tube, etc.) are among the known risk factors for *A. baumannii* colonization and infection [13]. In treating *A. baumannii* infections, it is important to consider the different treatment options available when considering resistance profiles. *A. baumannii* is currently resistant to many antibacterial agents. Although sulbactam was used to treat carbapenem-resistant clinical isolates against *A. baumannii* ten years ago, today the percentage of sulbactam resistance has also increased and it has been used in combination with  $\beta$ -lactam antibiotics. Similarly, in the treatment of nosocomial infections caused by *A. baumannii*, it is recommended to use combined regimens with other antimicrobials to prevent the possible development of resistance during treatment with tigecycline [14,15]. According to antimicrobial susceptibility test results, all strains were determined as multi-drug resistant. The colistin MIC values of *A. baumannii* isolates found ranged between 0.125-64 mg/l. It was determined that 8 (10.2%) of these strains were resistant to colistin. The distribution of MIC values of the isolates was given in Figure 1.

**Figure 1.** MIC values of *A. baumannii* isolates

### ERIC-PCR Analysis

Post-reaction amplicons indicated in Figure 2 were run on a 1.6% agarose gel at 65 volts for approximately 2 hours. They were stained with ethidium bromide solution and images were taken in a UV transilluminator (VersaDoc, Bio-Rad). Band profiles were analyzed using the GelAnalyzer2010a program. By using the UPGMA (Unweighted pair group method with mathematical averaging) method and the Dice similarity coefficient, the dendrogram of the band profiles was created and cluster analysis was performed. Cophenetic Correlation Coefficient (CP) = 0.84. FigTree v1.4.4. the phylogenetic tree was created with the program and given in Figure 3. It appears that the strains were collected in 2 clusters (A1 and A2) and cluster A2 was represented by a single genotype (C1). It was observed that there were 23 interrelated genotypes in cluster A1. It was observed that the genotypes of C7 and C3, SU3 and A7, M1 and C10, M24 and M20, M34 and M27, M6 and M2, SU1 and A4 were 99% identical to each other in Cluster A1. The SU3 and A7 genotypes were 98% identical to the C5 genotype. M1 and C10 genotypes were 98% identical to the A1 genotype. These two groups were 97% linked. There was a 96% similarity between these groups and the A8 genotype. It was observed that this group was associated with the genotype C7 and C3 at a rate of 95%. M2 and M6 genotypes were 98% identical to the M7 genotype. It was observed that M20, M24, M27, and M34 genotypes isolated from the same hospital had a 98% correlation with each other. They were 97% identical to the C19 genotype. It was found that the group with M2, M6, and M7 was 96% identical to this group. And SU1 and A6 genotypes were 98% identical to the C22 genotype.



**Figure 2.** ERIC-PCR gel images of *A. baumannii* isolates (M. Marker)

Among the PCR-based fingerprint techniques, ERIC-PCR is preferred as an economical, simple, and fast method used to identify and distinguish *Acinetobacter* species [16]. Therefore, it is important to control infections in hospitals and periodically monitor antimicrobial resistance patterns in different regions for infection control [17]. The study conducted by Fallah et al. investigated the genetic relationships of 82 *A. baumannii* isolates from a burn hospital with ERIC-PCR and revealed 14 different ERIC models, including 11 common types and three unique types [18]. Gautam et al. determined the clonal diversity of 22 *A. baumannii* from different clinics of a hospital and obtained 15 different patterns, 13 of which were unique and 2 were common, from the ERIC-PCR analysis [19]. Lotfi et al. examined the genetic relationship of 127 *A. baumannii* isolates from two teaching hospitals by ERIC-PCR and found that 88 isolates were divided into seven groups, while the remaining 21 isolates were single [20]. In our study, clonal diversity was determined in ERIC-PCR analysis, and according to the results of this study, for 24 *A. baumannii* and 24 different patterns were obtained, one unique and 23 common ERIC patterns.



## REFERENCES

1. Vincent, J.L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C.D., Reinhart, K. (2009). International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *Jama*, 302(21), 2323-2329. [\[CrossRef\]](#)
2. Roca, I., Espinal, P., Vila-Farrés, X., Vila, J. (2012). The *Acinetobacter baumannii* Oxymoron: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace. *Frontiers in Microbiology*, 3, 148-169.
3. Kiyasu, Y., Hitomi, S., Funayama, Y., Saito, K., Ishikawa, H. (2020). Characteristics of invasive *Acinetobacter* infection: A multicenter investigation with molecular identification of causative organisms. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 26(5), 475-482. [\[CrossRef\]](#)
4. Lima, W.G., Alves, M.C., Cruz, W.S., Paiva, M.C. (2018). Chromosomally encoded and plasmid-mediated polymyxins resistance in *Acinetobacter baumannii*: a huge public health threat. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 37(6), 1009-1019. [\[CrossRef\]](#)
5. An, J.H., Kim, Y.H., Moon, J.E., Jeong, J.H., Kim, S.H., Kang, S.J., Jang, H.C. (2017). Active surveillance for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a medical intensive care unit: Can it predict and reduce subsequent infections and the use of colistin?. *American Journal of Infection Control*, 45(6), 667-672. [\[CrossRef\]](#)
6. Antunes, L.C., Visca, P., Towner, K.J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathogens and Disease*, 71(3), 292-301. [\[CrossRef\]](#)
7. Maleki, A., Vandyousefi, J., Mirzaie, Z., Ghafourian, S., Kazemian, H., Sadeghifard, N. (2017). Molecular Analysis of the Isolates of *Acinetobacter baumannii* isolated from Tehran Hospitals Using ERIC-PCR Method. *Modern Medical Laboratory Journal*, 1(1), 12-16.
8. Aljindan, R., Alsamman, K., Elhadi, N. (2018). ERIC-PCR genotyping of *Acinetobacter baumannii* isolated from different clinical specimens. *Saudi Journal of Medicine and Medical Sciences*, 6(1), 13-17. [\[CrossRef\]](#)
9. Testing EUCAST (2016). EUCAST disk diffusion test manual, version 4.0.
10. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, valid from 2020-01-01. Basel, Switzerland: EUCAST [accessed 15 Mart 2020].
11. Dorneles, E.M., Santana, J.A., Ribeiro, D., Dorella, F.A., Guimaraes, A.S., Moawad, M.S., Lage, A.P. (2014). Evaluation of ERIC-PCR as genotyping method for *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates. *PLoS One*, 9(6), e98758. [\[CrossRef\]](#)
12. McConnell, M.J., Actis, L., Pachon, J. (2013). *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Review*, 37(2), 130-155. [\[CrossRef\]](#)
13. Fishbain, J., Peleg, A.Y. (2010). Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clinical Infectious Diseases*, 51(1), 79-84. [\[CrossRef\]](#)
14. Karaoglan, I., Zer, Y., Bosnak, V.K., Mete, A.O., Namiduru, M. (2013). In vitro synergistic activity of colistin with tigecycline or beta-lactam antibiotic/beta-lactamase inhibitor combinations against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of International Medical Research*, 41(6), 1830-1837. [\[CrossRef\]](#)
15. Principe, L., D'Arezzo, S., Capone, A., Petrosillo, N., Visca, P. (2009). In vitro activity of tigecycline in combination with various antimicrobials against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8, 18-29. [\[CrossRef\]](#)
16. Zarifi, E., Ghazalibina, M., Mansouri, S., Morshedi, K., Pourmajed, R., Arfaatabar, M. (2020). Molecular typing of *Acinetobacter baumannii* clinical strains by enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR). *Gene Reports*, 18, 100542. [\[CrossRef\]](#)
17. Hazhirkamal, M., Zarei, O., Movahedi, M., Karami, P., Shokoohizadeh, L., Taheri, M. (2021). Molecular typing, biofilm production, and detection of carbapenemase genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from different infection sites using ERIC-PCR in Hamadan, west of Iran. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 22(1), 32-32. [\[CrossRef\]](#)
18. Falah, F., Shokoohizadeh, L., Adabi, M. (2019). Molecular identification and genotyping of *Acinetobacter baumannii* isolated from burn patients by PCR and ERIC-PCR. *Scars, Burns and Healing*, 5, 2059513119831369. [\[CrossRef\]](#)
19. Gautam, H., Maheshwari, B., Mohapatra, S., Sood, S., Dhawan, B., Kapil, A., Tezpur, B. (2022). Clonal relationship among *Acinetobacter baumannii* isolates from different clinical specimens by ERIC-PCR. *International Journal of Infectious Diseases*, 116, S18-S19. [\[CrossRef\]](#)
20. Lotfi, F., Shojaie, M., Rahbarnia, L., Dehnad, A., Naghili, B., Lotfi, H. (2022). Molecular characterization and genetic diversity of multidrug- and extensively drug-resistant *A. baumannii* clinical isolates. *Gene Reports*, 26, 101455. [\[CrossRef\]](#)





## DESIGN AND SYNTHESIS OF SOME ARYLHYDRAZONE DERIVATIVES AS POTENTIAL FAAH INHIBITORS

*POTANSİYEL FAAH İNHİBİTÖRÜ OLARAK BAZI ARİLHİDRAZON TÜREVİ  
BİLEŞİKLERİN TASARIMI VE SENTEZİ*

Tugce GUR MAZ<sup>1\*</sup> , Sumeyye TURANLI<sup>1,2</sup> , H. Burak CALISKAN<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Gazi University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, 06530, Ankara,  
Turkey

<sup>2</sup>Adıyaman University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, 02040,  
Adıyaman, Turkey

<sup>3</sup>TOBB ETU Economy and Technology University, Faculty of Engineering, Department of  
Biomedical Engineering, 06560, Ankara, Turkey

### ABSTRACT

**Objective:** *The aim was to design, synthesis and investigation of possible interactions in the enzyme active site of a series of arylhydrazone derivatives for the inhibition of the FAAH enzyme. "*

**Material and Method:** *Arylhydrazone derivatives were obtained through the reaction of nicotinic hydrazone or benzohydrazone with appropriate aldehyde derivatives, and the obtained crude product was recrystallized from ethanol. After elucidating chemical structures of the compounds via spectroscopic methods, the inhibitory activities against hFAAH were screened. The results were further supported with molecular modeling studies.*

**Result and Discussion:** *In this study, a new series of seven arylhydrazone derivatives were screened against hFAAH. 4-phenoxyphenyl bearing derivative 5 was found to inhibit hFAAH 40 % at 10 µM which indicates that newly developed inhibitor could serve as a starting point for improving inhibitory effect of the new series.*

**Keywords:** *Arylhydrazones, FAAH, heterocycles, inflammation*

### ÖZ

**Amaç:** *FAAH enziminin inhibisyonu amacıyla bir seri arilhidrazon türevi bileşiğin tasarımı, sentezi ve enzim aktif bölgesinde olası etkileşimlerinin incelenmesidir.*

\* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Tugce Gur Maz  
**e-mail / e-posta:** ztugcegur@gazi.edu.tr, **Phone / Tel.:** +90 312 202 3223

**Gereç ve Yöntem:** Nikotinik hidrazit veya benzohidrazidin uygun aldehit türevleri ile reaksiyonu sonucu arilhidrazon türevleri elde edilmiş, elde edilen ham ürünler etanolden rekristalize edilmiştir. Bileşiklerin yapısı spektroskopik yöntemler ile aydınlatıldıktan sonra hFAAH enzimine karşı aktiviteleri taranmıştır. Elde edilen sonuçlar moleküler modelleme çalışmaları ile desteklenmiştir.

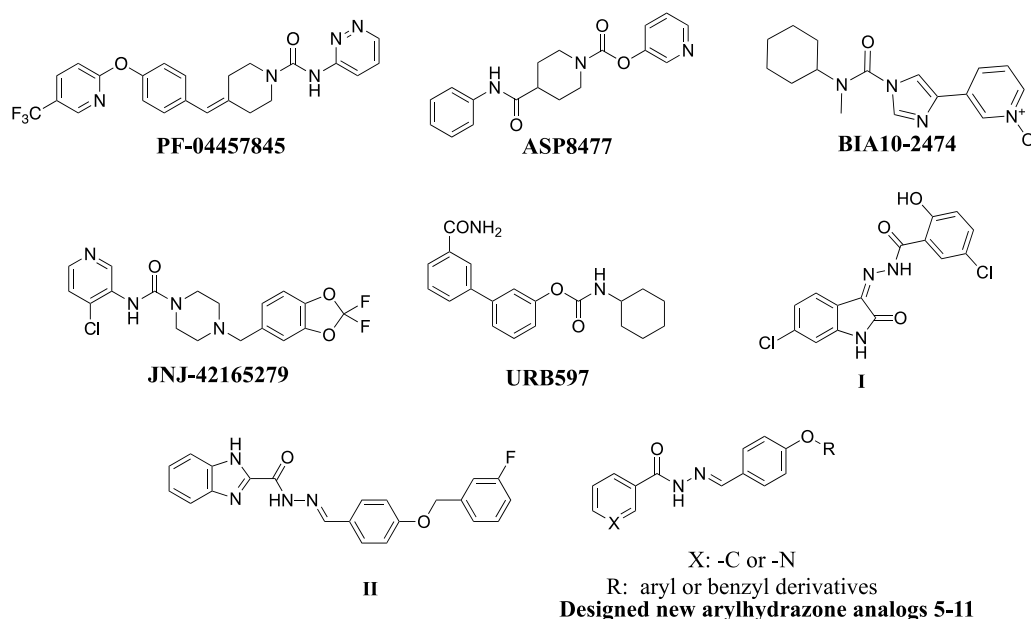
**Sonuç ve Tartışma:** Bu çalışmada, bir seri yedi arilhidrazon türevi hFAAH'a karşı taranmıştır. 4-fenoksifenil içeren türev olan Bileşik 5'in 10  $\mu$ M'de hFAAH'ı % 40 oranında inhibe ettiği bulunmuş olup; ileri çalışmalarda potansiyel hFAAH inhibitörü olarak kullanılabilir yeni bir arilhidrazon türevine ulaşılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Arilhidrazonlar, FAAH, heterosiklikler, inflamasyon

## INTRODUCTION

FAAH (Fatty Acid Amide Hydrolase) is a membrane enzyme and a member of serine hydrolase family with a catalytic triad comprising Ser217, Ser 241 and Lys142. FAAH is responsible for the hydrolysis of the endogenous cannabinoid (eCB) anandamide (AEA). The cannabinoid receptors CB1 and CB2 are activated by endogenous lipid endocannabinoids, such as AEA and 2-arachidonylglycerol (2-AG) [1, 2]. The eCB system regulates several physiological processes in the central nervous system (CNS). Disruptions in the eCB have been thought to be linked to several pathological conditions such as neuropsychiatric disorders, inflammation, and pain [2-4]. The altered levels of FAAH have been found in patients suffering from Alzheimer's and Huntington's diseases. Inhibition of FAAH have been observed to induce an increase in the level of endogen AEA and other FAAs, resulting analgesic, antiinflammatory, antidepressant and anxiolytic effects without introducing severe adverse effects which have been seen with direct CB receptor agonists such as cannabis [5]. Pre-clinical significance of FAAH inhibition suggested that FAAH may be an important therapeutic target in the treatment of some neurological disorders [6].

In the past years, different chemotypes possessing many potent FAAH inhibitors have been developed some of which have even carried into clinical trials to assess their potential against anxiety, mood disorders, osteoarthritis and cannabis withdrawal syndrome (Figure 1) [7-9]. Amongst others, the one with **BIA 10-2474** was shown severe adverse effect [10]. Recently, **PF-04457845** was found to be effective in cannabis withdrawal syndrome in a Phase II study [11], however, none of these inhibitors have reached to the market yet.



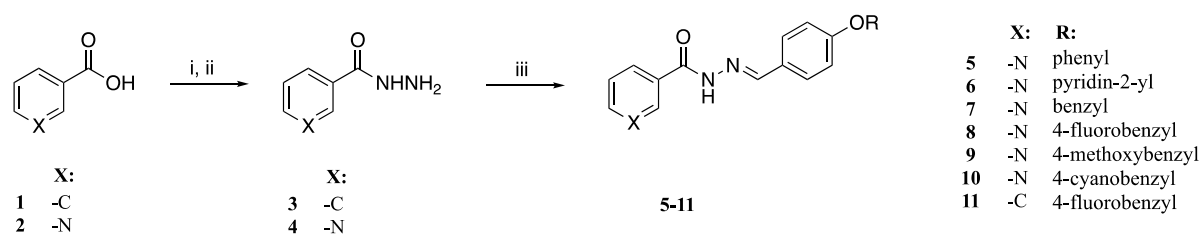
**Figure 1.** Some known FAAH inhibitors.

Different types of scaffolds have been identified as FAAH inhibitors and yet, mostly, urea and carbamate bearing compounds have been reported [4,11,12]. Recently, carbohydrazone based **I** and **II** (Figure 1) have been identified as FAAH inhibitors [13,14]. Inspired by the reported compounds in the literature, we aimed to identify potential FAAH inhibitors that might serve as suitable new chemical libraries for further development. Having set this purpose, we designed a small series of arylhydrazone derivatives and evaluated them against human FAAH (hFAAH).

## MATERIAL AND METHOD

### Chemistry

All starting materials were purchased from Merck. The reactions were verified with TLC using silica gel plates, which were visualized under 254 nm UV light. The NMR spectra of the compounds were recorded on a Varian Mercury 400 MHz or Bruker Avance NEO 500 MHz spectrometers. Final compounds were recrystallized from ethanol. Purity of the compounds were verified by UPLC-MS system interconnecting with time of flight (TOF) in electrospray ionization in ESI (+) mode. Stuart SMP50 melting point apparatus was used for determination of the melting points of the compounds. The chemical structures of the compounds were characterized using  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra which were recorded in  $\text{DMSO-d}_6$ .



*Reagent and conditions:* i)  $\text{MeOH}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\Delta$ ; ii) hydrazine hydrate,  $\text{MeOH}$ ,  $\Delta$ ; iii) 4-phenoxybenzaldehyde (for **5**); 4-(pyridin-2-yloxy)benzaldehyde (for **6**); 4-(benzyloxy)benzaldehyde (for **7**); 4-(fluorobenzoyloxy)benzaldehyde (for **8**); 4-(methoxybenzyloxy)benzaldehyde (for **9**); 4-(cyanobenzoyloxy)benzaldehyde (for **10**); 4-(fluorobenzoyloxy)benzaldehyde (for **11**);  $\text{EtOH}$ ,  $\Delta$ , 2h.

**Figure 2.** Synthetic route of title compounds.

*Benzohydrazide (3) and pyridine-3-carbohydrazide (4).* To a solution of **1** (3.3 mmol, 1 eq) or **2** (15.1 mmol, 1 eq) were dissolved in  $\text{EtOH}$  (10 ml), conc. sulfuric acid (3 ml) was added onto it carefully, and the resulting mixture was refluxed overnight. After cooling it to rt, the excess of solvent evaporated. pH was neutralized with  $\text{NaHCO}_3$  solution, and the precipitated product was filtered and dried to give ethylbenzoate and ethyl pyridine-3-carboxylate, respectively. To a solution of ethylbenzoate and ethyl pyridine-3-carboxylate in  $\text{EtOH}$ , hydrazine hydrate was added (1.5 eq). The resulting mixture was refluxed overnight. After cooling to RT, the precipitated solid was filtered from  $\text{EtOH}$  to obtain the crude **3** or **4** which were used without further purification. The data for **3** are as follows: Yield: overall 2 steps, 34.5%. Mp 114.5-116.4°C, 114-115°C [15]. The data for **4** are as follows: Yield: overall 2 steps, 29.4%. Mp 150-152°C, 154-155°C [16].

### General Procedure for the Synthesis of 5-11

To a solution of arylhydrazides (**3** or **4**) (1 eq) in  $\text{EtOH}$ , corresponding aldehydes were added and the resulting mixture was refluxed for 2 hours. After cooling to RT, the solution was filtered and recrystallized from ethanol to obtain arylhydrazone derivatives (**5-11**).

*N'-[(E)-(4-phenoxyphenyl)methylidene]pyridine-3-carbohydrazide (5).* Yield: 78%. Mp 136.0-138.0°C.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  7.06-7.12 (4H, m), 7.21 (1H, t,  $J = 7.5$  Hz), 7.45 (2H, t,  $J = 8.0$  Hz), 7.57 (1H, dd,  $J = 8.0, 5.0$  Hz), 7.76 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz), 8.28 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz), 8.48 (1H, s), 8.76-8.77 (1H, m), 8.95, 9.09 (1H, d,  $J = 1.5$  Hz), 12.07 (1H, s);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$

118.7, 119.9, 124.1, 124.7, 129.6, 129.7, 130.7, 135.9, 148.3, 149.1, 152.7, 156.2, 159.2, 162.1. HRMS (m/z) [M+H]<sup>+</sup> calculated for C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: 318.1243; found: 318.1233. CAS # 358767-07-4.

*N'*-[(*E*)-[4-(pyridin-2-yloxy)phenyl]methylidene]pyridine-3-carbohydrazide (6). Yield: 47%. Mp 181.2-182.8°C. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.10 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.16-7.23 (3H, m), 7.57 (1H, dd, *J* = 7.6, 5.2 Hz), 7.79 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.87-7.92 (1H, m), 8.13-8.27 (2H, m), 8.47 (1H, s), 8.77 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.2 Hz), 8.95, 9.08 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 12.0 (1H, s); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 112.0, 119.5, 121.4, 123.6, 128.7, 129.2, 130.3, 135.5, 140.4, 147.5, 147.8, 148.6, 152.3, 155.6, 161.6, 162.6. HRMS (m/z) [M+H]<sup>+</sup> calculated for C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 319.1195; found: 319.1190.

*N'*-[(*E*)-[4-(benzyloxy)phenyl]methylidene]pyridine-3-carbohydrazide (7). Yield: 65%. Mp 166.2-167.7°C. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 5.14, 5.17 (2H, 2s), 7.05-7.13 (2H, m), 7.34-7.49 (5H, m), 7.56 (1H, dd, *J* = 8.0, 5.0 Hz), 7.70 (2H, d, *J* = 8.5 Hz), 8.26 (1H, dt, *J* = 8.0, 2.0 Hz), 8.41 (1H, s), 8.76-8.77 (1H, m), 8.95, 9.07 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 11.8, 11.9 (1H, 2s); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 69.8, 115.7, 124.1, 127.4, 128.3, 128.4, 128.9, 129.3, 129.8, 135.9, 137.2, 148.7, 149.0, 152.7, 160.5, 162.0. HRMS (m/z) [M+H]<sup>+</sup> calculated for C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: 332.1399; found: 332.1402. CAS # 292180-66-6.

*N'*-[(*E*)-{4-[4-(4-fluorophenyl)methoxy]phenyl}methylidene]pyridine-3-carbohydrazide (8). Yield: 63%. Mp 182.3-184.2°C. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 5.11, 5.15 (2H, 2s), 7.03-7.12 (2H, m), 7.23 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.48-7.58 (3H, m), 7.70 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 8.25 (1H, dt, *J* = 8.0, 2.0 Hz), 8.39 (1H, s), 8.74 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.2 Hz), 8.95, 9.06 (1H, d, *J* = 1.6 Hz), 11.8, 11.9 (1H, 2s); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 68.7, 115.2, 115.3 (<sup>2</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 21.1 Hz), 123.6, 126.9, 128.8, 129.3, 130.0 (<sup>3</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 8.4 Hz), 132.9 (<sup>4</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 2.6 Hz), 135.4, 148.2, 148.5, 152.2, 159.9, 161.5, 161.8 (<sup>1</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 242.4 Hz). HRMS (m/z) [M+H]<sup>+</sup> calculated for C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>F: 350.1305; found: 350.1304.

*N'*-[(*E*)-{4-[4-(4-methoxyphenyl)methoxy]phenyl}methylidene]pyridine-3-carbohydrazide (9). Yield: 70%. Mp 201.5-203.4°C. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3.76 (3H, s), 5.04, 5.08 (2H, 2s), 6.95 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.02-7.10 (2H, m), 7.36-7.41 (2H, m), 7.46-7.57 (1H, m), 7.69 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.25 (2H, dt, *J* = 8.0, 2.0 Hz), 8.75 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz), 8.94, 9.06 (1H, d, *J* = 1.6 Hz), 11.8, 11.9 (1H, 2s); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 55.1, 69.2, 113.8, 115.2, 123.6, 126.7, 128.6, 128.8, 129.3, 129.6, 135.4, 148.3, 148.5, 152.2, 159.1, 160.2, 161.5. HRMS (m/z) [M+H]<sup>+</sup> calculated for C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: 362.1505; found: 362.1504.

*N'*-[(*E*)-{4-[4-(4-cyanophenyl)methoxy]phenyl}methylidene]pyridine-3-carbohydrazide (10). Yield: 79%. Mp 217.8-219.2°C. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 5.25, 5.29 (2H, 2s), 7.04-7.13 (2H, m), 7.48-7.58 (1H, m), 7.62-7.71 (4H, m), 7.88 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.24 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 8.39 (1H, s), 8.75 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.2 Hz), 8.94, 9.05 (1H, d, *J* = 1.2 Hz), 11.8, 11.9 (1H, 2s); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 63.4, 110.6, 115.2, 118.8, 123.6, 127.2, 128.2, 128.9, 129.3, 132.5, 125.4, 142.6, 148.1, 148.6, 152.2, 159.7, 161.5. HRMS (m/z) [M+H]<sup>+</sup> calculated for C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 357.1352; found: 357.1336.

*N'*-[(*E*)-{4-[4-(4-fluorophenyl)methoxy]phenyl}methylidene]benzohydrazide (11). Yield: 69%. Mp 212.1-213.8°C. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 5.15, 5.17 (2H, 2s), 7.12 (2H, t, *J* = 8.8 Hz), 7.22 (2H, t, *J* = 8.8 Hz), 7.5-7.6 (4H, m), 7.68 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.81 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.91 (2H, d, *J* = 8.5 Hz), 8.42, 8.62 (1H, 2s), 11.7 (1H, s); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 68.6, 115.1, 115.2 (<sup>2</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 21.2 Hz), 126.8, 127.1, 127.4, 128.3, 128.6, 129.8 (<sup>3</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 8.3 Hz), 131.5, 132.9 (<sup>4</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 2.5 Hz), 133.5, 147.6, 159.7, 161.7 (<sup>1</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 241.8 Hz). HRMS (m/z) [M+H]<sup>+</sup> calculated for C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 349.1352; found: 349.1346. CAS # 339252-31-2.

## Biological Activity

The FAAH assay kit was purchased from Cayman Chemical (Item no: 10005196). The assay protocol was followed to evaluate FAAH inhibition. Briefly, 170 µl of assay buffer (125 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1 mM EDTA) was loaded into each well in which 10 µl of inhibitor was then added. Then 10 µl of diluted FAAH enzyme was added to each well and incubated for 5 minutes at 37°C. After incubation, 10 µl of substrate AMC arachidonoyl amide (7-amino-4-methyl coumarin-arachidonamide) was added to start the reaction which was allowed to incubate at 37 °C for 30 minutes. The absorbance of the blank was extracted from initial activity and inhibitor wells. Calculation of the percent inhibition for each compound was done as stated below:

$$\text{Inhibition \%} = [(\text{Initial activity}-\text{sample})/\text{Initial activity}] \times 100$$

## Molecular Modeling

The X-ray structure of ligand bound FAAH was loaded from the Protein Data Bank (ID 3QK5). The solvent molecules were retained and the protein was preprocessed, optimized and minimized at pH 7.4 using OPLS4 force field in the Schrödinger Protein Preparation Wizard. The grid was positioned at the centre of the bound ligand, and generated using Glide's Receptor Grid Generation module without changing built-in settings. The ligand molecules were prepared using the LigPrep at pH 7.4. Ligand docking was then run with a scaling factor of van der Waals radii 0.90. Only trans conformations were allowed for amides in bias sampling. Strain correction terms were applied for the final output.

## RESULT AND DISCUSSION

### Chemistry

The synthesis of compounds was accomplished according to the synthetic sequence as demonstrated in Figure 2. In the first step, carboxylic acid derivatives (**1-2**) were reacted with hydrazine hydrate in ethanol to give arylhydrazides (**3-4**) which were converted into corresponding arylhydrazone derivatives (**5-11**) by reacting commercial aldehyde derivatives which were recrystallized from ethanol, then.  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra of the compounds were recorded in  $\text{DMSO-d}_6$ . Arylhydrazones are suggested to have four possible isomers in  $\text{DMSO-d}_6$ . The two derive from geometrical isomers in respect to  $\text{C}=\text{N}$  double bond, and the other two as *syn/antiperiplanar* conformers around the amide  $\text{CO-NH}$  bond. N-acylhydrazones derived from aromatic aldehydes in solution are anticipated to be in the  $\text{E}_{\text{C}=\text{N}}$  form because  $\text{Z}_{\text{C}=\text{N}}$  isomer is not observed due to steric hindrance in hydrazones of aldehydes [17-19]. Also, NH signals of  $\text{Z}_{\text{C}=\text{N}}$  isomer of arylhydrazones are reported at around 14 ppm [20].

2 singlet signals indicating imino hydrogen ( $\text{CH}=\text{N}$ ) were observed at 9.09-8.62 and 8.95-8.42 ppm; the *syn/anti* methylene protons ( $\text{CH}_2\text{CO}$ ) were also observed typically as 2 singlet signals at 5.07-5.29 and 5.11-5.25 ppm, respectively, all compounds favoring E isomer in  $\text{DMSO-d}_6$ . The two sets of isomers that belong to methylen protons ( $\text{N}=\text{CH}$ ) and NH protons of the hydrazide is well resolved in **5-11** (Table 1). According to the literature, the most stable isomers are E form in respect to  $\text{C}=\text{N}$  bond and *antiperiplanar* conformer around the  $\text{CO-NH}$  bond. The  $\text{CO-NH}$  protons of *anti* conformer was resonated as broad singlets at around 11.9 ppm downfield area whilst *syn* conformer was around at about 11.8 ppm. *Antiperiplanar* conformers were dominant over *synplanar* form as suggested by the literature. The  $\text{N}=\text{CH}$  proton of carbohydrazone moiety was resonated at about 9.09 ppm for the *antiperiplanar* form while *syn* form was appeared at about 8.94 ppm (Figure 3). Methylene protons belonging to **7-11** were resonated as two singlets at 5.15 and 5.17 ppm.

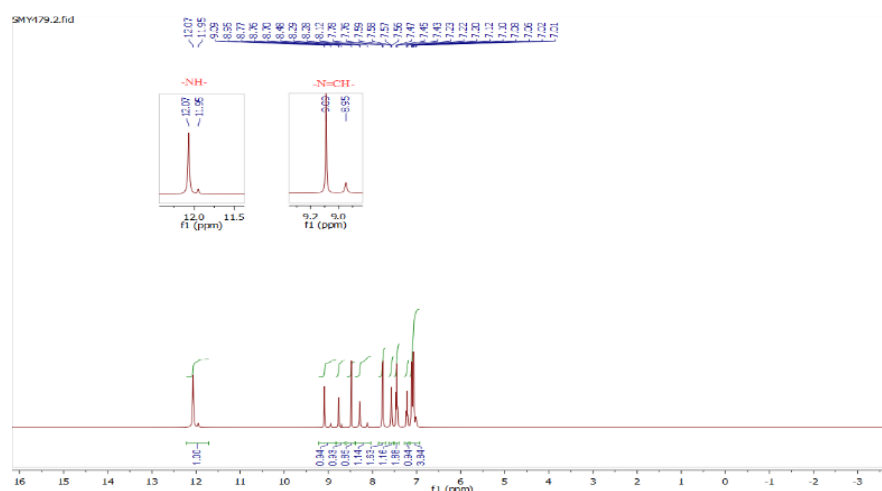


Figure 3. Representative  $^1\text{H-NMR}$  spectra of **5**.

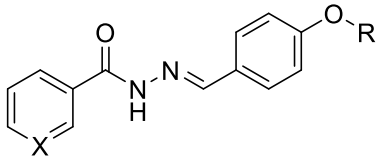
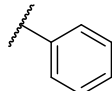
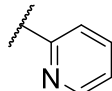
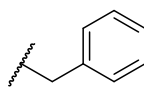
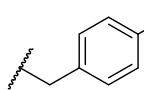
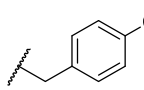
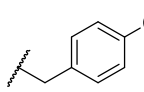
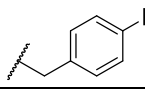
The intensity of the peaks allowed us to quantify the ratio of the conformers. The integral intensities of C=NH allowed us to quantify the ratio of the conformers (*anti/syn*) as demonstrated in Table 1. The calculations were revealed that these compounds contained *anti/syn* conformers in a ratio of 85:15 approximately, except compound **11**.

**Table 1.** Ratio of conformers in DMSO-d<sub>6</sub>\*

Compound	<i>anti</i> conformer	<i>syn</i> conformer	Isomeric Ratio
	ppm	ppm	
<b>5</b>	9.09	8.95	80.6:19.4
<b>6</b>	9.06	8.95	87.7:12.3
<b>7</b>	9.07	8.95	84.7:12.3
<b>8</b>	9.06	8.93	88.2:11.8
<b>9</b>	9.07	8.94	87.9:12.1
<b>10</b>	9.06	8.94	86.4:13.6
<b>11</b>	8.62	8.42	21.5:78.5

\* calculated from relative integration of N=CH proton.

**Table 2.** % FAAH inhibition of arylhydrazones (**5-11**).

				
#	-X	-R	10 μM	1 μM
<b>5</b>	- N		<b>40.4</b>	23.7
<b>6</b>	- N		<b>37.8</b>	25.4
<b>7</b>	- N		12.3	2.8
<b>8</b>	- N		N.I	N.I
<b>9</b>	- N		2.1	2.2
<b>10</b>	- N		<b>32.7</b>	24.1
<b>11</b>	- CH		5.5	N.I

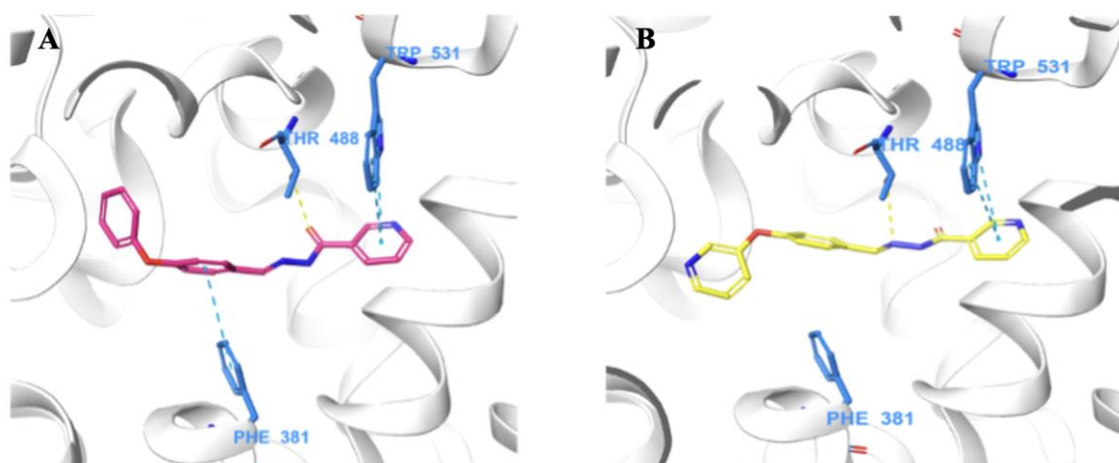
N.I: no inhibition

## Biological Activity

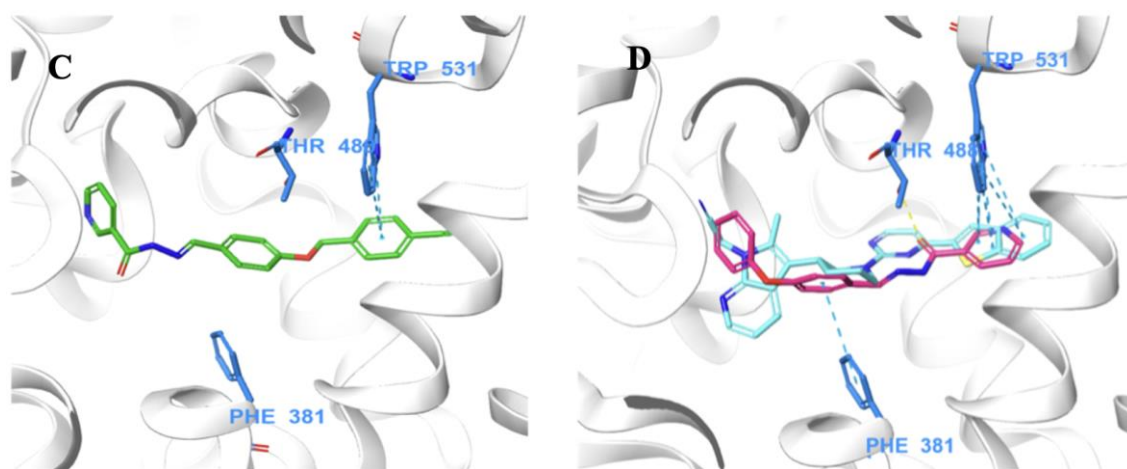
The compounds were tested against hFAAH at 10  $\mu\text{M}$  and 1  $\mu\text{M}$ , respectively (Table 2). Compounds **5-6**, which were derived from nicotinic hydrazide, were found to inhibit hFAAH at 10  $\mu\text{M}$  about 40%. An additional methylene linkage between aryloxy and phenyl fragments were caused decrease in inhibitory effect of **7-9** while remaining activity in **10** which could be explained by the different electronic properties of the substituents. These findings suggest that the newly identified inhibitors may be used as a starting point for the development of more potent inhibitors.

## Molecular Modeling

Molecular docking of the compounds was carried out as described in the Material and Method section. Briefly, an X-ray crystal image with a bound ligand from the PDB (ID:3QK5) was uploaded in the Schrödinger Maestro Docking Suite. The docking parameters were then optimized by docking the X-ray ligand into the active site of the FAAH until the parameters yield a superposition of the ligand. The docking results of binding interactions of three compounds (**5-6** and **10**) show considerable agreement with their activities. In other words, the inhibitory activities of the compounds (40.4% inhibition for **5**, 37.8% inhibition for compound **6** and 32.7% inhibition for **10**) could be explained with binding interactions as revealed in their docking poses (Figure 4-5).



**Figure 4.** Predicted binding modes of **5** (A) and **6** (B) in the active site of hFAAH (PDB ID: 3QK5)



**Figure 5.** Predicted binding modes of **10** (C) and superposition of **5** with the crystal ligand (D) (PDB ID: 3QK5)

More specifically, compound **5** was found to interact with TRP531 via two  $\pi$ - $\pi$  stacking bonds, with THR488 via a hydrogen bond and with PHE381 via a  $\pi$ - $\pi$  stacking bond. Because the molecular structures differ only with the replacement of a carbon atom with a nitrogen in compound **6**, binding modes of compound **6** and compound **5** are similar. Whereas compound **5** binds to THR488 through its oxygen atom, compound **6** makes the same interaction with THR488 via its nitrogen. The difference between binding modes and hence, probably, activities may arise from the lack of  $\pi$ - $\pi$  stacking with PHE381 in **6**. With respect to **10**, as opposed to **5** and compound **6**, it binds to the TRP531 with two  $\pi$ - $\pi$  stacking bonds, lacking both the THR488 and PHE381 interactions. This could contribute to the lower activity of **10** compared to either **5** or compound **6** (Figure 5). The highest activity of **5** might be explained through its interactions with three residues, while the second highest activity may reflect the fact that **6** interacts with two residues and the compound with the lowest activity, that is **10**, interacts with only a single residue. However, it should be noted that the number of interactions is not the only factor that contributes to the activity. For instance, the X-ray crystal ligand interacts only with TRP531 through four  $\pi$ - $\pi$  stacking bonds. Four bonds in total are expected to contribute to the activity of the ligand and yet high inhibition potential most probably arises from the efficient blocking of the active site to be biologically relevant. The molecules in this work also hint the same line of reasoning. The binding mode of **10** is broadly different compared to either **5** or **6** as there is no interaction towards the active site which is thought to be related with its lowest activity.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Prof. Dr. Burcu Caliskan for providing her expertise in this research. This research is financially supported by Gazi University Research Project Unit (BAP: 02/2020-24).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: T.G.M., S.T., H.B.C.; Design: T.G.M., S.T., H.B.C.; Control: T.G.M.; Sources: T.G.M.; Materials: T.G.M., S.T., H.B.C.; Data Collection and/or Processing: T.G.M., S.T., H.B.C.; Analysis and/or Interpretation: T.G.M., S.T., H.B.C.; Literature Review: T.G.M., S.T., H.B.C.; Manuscript writing: T.G.M., S.T., H.B.C.; Critical Review: T.G.M., S.T., H.B.C.; 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 research.

## REFERENCES

1. Van Egmond, N., Straub, V.M., van der Stelt, M. (2021). Targeting Endocannabinoid Signaling: FAAH and MAG Lipase Inhibitors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 61, 441-463. [\[CrossRef\]](#)
2. Mechoulam, R., Parker, L. A. (2013). The Endocannabinoid System and the Annual Review of Psychology, 64(1), 21-47. [\[CrossRef\]](#)
3. Lutz, B., Marsicano, G., Maldonado, R., Hillard, C.J. (2015). The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(12), 705-718. [\[CrossRef\]](#)
4. Tuo, W., Leleu-Chavain, N., Spencer, J., Sansook, S., Millet, R., Chavatte, P. (2017). Therapeutic Potential of Fatty Acid Amide Hydrolase, Monoacylglycerol Lipase, and N-Acylethanolamine Acid Amidase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(1), 4-46. [\[CrossRef\]](#)
5. Sachs, J., McGlade, E., Yurgelun-Todd, D. (2015). Safety and Toxicology of Cannabinoids. *Neurotherapeutics*, 12(4), 735-746. [\[CrossRef\]](#)
6. Bajaj, S., Jain, S., Vyas, P., Bawa, S., Vohora, D. (2021). The role of endocannabinoid pathway in the neuropathology of Alzheimer's disease: Can the inhibitors of MAGL and FAAH prove to be potential



- therapeutic targets against the cognitive impairment associated with Alzheimer's disease? *Brain Research Bulletin*, 174, 305-322. [\[CrossRef\]](#)
7. Bonifácio, M.J., Sousa, F., Aires, C., Loureiro, A.I., Fernandes-Lopes, C., Pires, N.M., Palma, P.N., Moser, P., Soares-da-Silva, P. (2020). Preclinical pharmacological evaluation of the fatty acid amide hydrolase inhibitor BIA 10-2474. *British Journal of Pharmacology*, 177(9), 2123-2142. [\[CrossRef\]](#)
  8. Ahn, K., Smith, S.E., Liimatta, M.B., Beidler, D., Sadagopan, N., Dudley, D.T., Young, T., Wren, P., Zhang, Y., Swaney, S., Van Becelaere, K., Blankman, J.L., Nomura, D.K., Bhattachar, S.N., Stiff, C., Nomanbhoy, T.K., Weerapana, E., Johnson, D.S., Cravatt, B.F. (2011). Mechanistic and pharmacological characterization of PF-04457845: a highly potent and selective fatty acid amide hydrolase inhibitor that reduces inflammatory and noninflammatory pain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 338(1), 114-124. [\[CrossRef\]](#)
  9. Ahn, K., Johnson, D.S., Mileni, M., Beidler, D., Long, J.Z., McKinney, M.K., Weerapana, E., Sadagopan, N., Liimatta, M., Smith, S. E., Lazerwith, S., Stiff, C., Kamtekar, S., Bhattacharya, K., Zhang, Y., Swaney, S., Van Becelaere, K., Stevens, R.C., Cravatt, B.F. (2009). Discovery and characterization of a highly selective FAAH inhibitor that reduces inflammatory pain. *Chemistry & Biology*, 16(4), 411-420. [\[CrossRef\]](#)
  10. Rocha, J.F., Santos, A., Gama, H., Moser, P., Falcao, A., Pressman, P., Wallace Hayes, A., Soares-da-Silva, P. (2022). Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of FAAH Inhibitor BIA 10-2474: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study in Healthy Volunteers. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 111(2), 391-403. [\[CrossRef\]](#)
  11. Tripathi, R.K.P. (2020). A perspective review on fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors as potential therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 188, 111953. [\[CrossRef\]](#)
  12. Fazio, D., Criscuolo, E., Piccoli, A., Barboni, B., Fezza, F., Maccarrone, M. (2020). Advances in the discovery of fatty acid amide hydrolase inhibitors: what does the future hold? *Expert Opinion on Drug Discovery*, 15(7), 765-778. [\[CrossRef\]](#)
  13. Shang, Y., Hao, Q., Jiang, K., He, M., Wang, J. (2020). Discovery of heterocyclic carbonylhydrazide derivatives as novel selective fatty acid amide hydrolase inhibitors: design, synthesis and anti-neuroinflammatory evaluation. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 30(10), 127118. [\[CrossRef\]](#)
  14. Jaiswal, S., Ayyannan, S.R. (2022). Discovery of Isatin-Based Carbonylhydrazones as Potential Dual Inhibitors of Fatty Acid Amide Hydrolase and Monoacylglycerol Lipase. *ChemMedChem*, 17(1), e202100559. [\[CrossRef\]](#)
  15. Freitas, R., Barbosa, J.M.C., Bernardino, P., Sueth-Santiago, V., Wardell, S., Wardell, J.L., Decote-Ricardo, D., Melo, T. G., da Silva, E.F., Salomao, K., Fraga, C.A.M. (2020). Synthesis and trypanocidal activity of novel pyridinyl-1,3,4-thiadiazole derivatives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 127, 110162. [\[CrossRef\]](#)
  16. Fugard, A.J., Thompson, B.K., Slawin, A.M., Taylor, J.E., Smith, A.D. (2015). Organocatalytic Synthesis of Fused Bicyclic 2,3-Dihydro-1,3,4-oxadiazoles through an Intramolecular Cascade Cyclization. *Organic Letters*, 17(23), 5824-5827. [\[CrossRef\]](#)
  17. Sarıgöl, D., Yüksel, D., Okay, G., Uzgören-Baran, A. (2015). Synthesis and structural studies of acyl hydrazone derivatives having tetrahydrocarbazole moiety. *Journal of Molecular Structure*, 1086, 146-152. [\[CrossRef\]](#)
  18. Syakaev, V.V., Podyachev, S.N., Buzykin, B.I., Latypov, S.K., Habicher, W.D., Kononov, A.I. (2006). NMR study of conformation and isomerization of aryl- and heteroarylaldehyde 4-tert-butylphenoxyacetylhydrazones. *Journal of Molecular Structure*, 788(1-3), 55-62. [\[CrossRef\]](#)
  19. Alp, A.S., Kilcigil, G., Ozdamar, E.D., Coban, T., Eke, B. (2005). Synthesis and evaluation of antioxidant activities of novel 1,3,4-oxadiazole and imine containing 1H-benzimidazoles. *Turkish Journal of Chemistry*, 39, 42-53. [\[CrossRef\]](#)
  20. Munir, R., Javid, N., Zia-Ur-Rehman, M., Zaheer, M., Huma, R., Roohi, A., Athar, M.M. (2021). Synthesis of Novel N-Acylhydrazones and Their C-N/N-N Bond Conformational Characterization by NMR Spectroscopy. *Molecules*, 26(16), 4918. [\[CrossRef\]](#)



## THE EFFECTS OF MELATONIN, FLUOXETINE AND THEIR COMBINATIONS ON STRESS-INDUCED BEHAVIORAL AND COGNITIVE IMPAIRMENTS IN MICE

*FARELERDE STRESİN NEDEN OLDUĞU DAVRANIŞSAL VE KOGNİTİF BOZUKLUKLARA MELATONİN, FLUOKSETİN VE KOMBİNASYONLARININ ETKİSİ*

Merve İNCİ ÇAMÇI<sup>1\*</sup>, Meral ERDİNÇ<sup>2</sup>, İlker KELLE<sup>2</sup>, Emre UYAR<sup>3</sup>,  
Levent ERDİNÇ<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Dicle Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Ana Bilim Dalı, 21280, Diyarbakır, Türkiye

<sup>2</sup>Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı, 21280, Diyarbakır, Türkiye

<sup>3</sup>İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Ana Bilim Dalı, 44000, Malatya, Türkiye

<sup>4</sup>Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, 21280, Diyarbakır, Türkiye

### ABSTRACT

**Objective:** Melatonin (Mlt) is a hormone with antidepressant and antioxidant features. It is well known that Mlt protects brain cells from reactive oxygen species and that the brain's high oxygen consumption and lipid content make it particularly vulnerable to oxidative stress caused by prolonged stress. This study aims to investigate the effects of melatonin, fluoxetine (Flx) and their combinations on emotional memory, depression, and anxiety-like behavioral changes induced by immobilization (Imb) stress.

**Material and Method:** 48 male Balb/c mice were divided into eight groups: Cnt (control), Imb, Imb+Mlt, Imb+Flx, Imb+Mlt+Flx, Mlt, Flx and Mlt+Flx. For seven days in a row, the mice underwent daily immobilization stress for 6 hours. Mice were treated with Mlt (10 mg/kg) and Flx (20 mg/kg) or saline 30 min prior to the immobilization stress procedure. All animals were subjected to behavioral tests; forced swimming test (FST), open field test (OFT), elevated plus maze (EPM), passive avoidance test (PAT), and hot plate (HP) test. After all behavioral tests, brain tissues were obtained for malondialdehyde (MDA) level analysis.

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

**Result and Discussion:** *OFT test data showed the time spent in the central zone and the number of entrances to the central area were lower in the Imb group compared to the Cnt group; these were higher in the Imb+Flx, Imb+Mlt, Imb+Mlt+Flx groups compared to the Imb group. Also, according to the data obtained from FST, immobile time was significantly higher in the Imb group compared to the Cnt group, and it was lower in the Imb+Flx, Imb+Mlt, Imb+Mlt+Flx groups compared to the Imb group. Besides, it was demonstrated that the emotional memory index was statistically higher in the Imb group compared to the Cnt group, and the increasing of memory index returned to normal in the Imb+Mlt and Imb+Mlt+Flx groups with PAT. Furthermore, lipid peroxidation level, which increased in the Imb group, decreased significantly in the Imb+Flx, Imb+Mlt, and Imb+Mlt+Flx groups. As a result, it was observed that melatonin has antidepressant, anxiolytic, antioxidant effects and normalized emotional memory. Also, melatonin, fluoxetine, and their combinations exert similar effects in the present study.*

**Keywords:** *Anxiety, depression, emotional memory, melatonin, stress*

## ÖZ

**Amaç:** *Melatonin (Mlt) antidepresan ve antioksidan özellikleri olduğu bilinen, yüksek lipid içeriği ve oksijen tüketimi nedeniyle oksidatif strese oldukça duyarlı olan beyin dokularını uzun süreli stresin neden olduğu reaktif oksijen türlerine karşı koruyan bir hormondur. Bu çalışmada melatonin, fluoksetin (Flx) ve kombinasyonlarının immobilizasyon stres ile meydana gelen duygusal öğrenme, depresyon ve anksiyete benzeri davranışsal değişiklikler üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.*

**Gereç ve Yöntem:** *48 erkek Balb/c fare 8 gruba ayrılmıştır: Cnt (kontrol), Imb (immobilizasyon), Imb+Mlt, Imb+Flx, Imb+Mlt+Flx, Mlt, Flx ve Mlt+Flx. Farelere immobilizasyon stress prosedüründen 30 dk önce Mlt (10 mg/kg), Flx (20 mg/kg) veya salin enjekte edildi. Immobilizasyon stress prosedürü 7 ardışık gün, günde 6 saat uygulandı. Ardından tüm denekler davranış testlerine tabi tutuldu: zorunlu yüzme (FST), açık alan (OFT), yükseltilmiş artı labirenti (EPM), pasif sakinme (PAT) ve hot plate (HP) testi. Davranış testlerinden sonra malondialdehit (MDA) düzeyi analizi için beyin dokuları izole edildi.*

**Sonuç ve Tartışma:** *Açık alan testi verilerine göre, Imb grubunda Cnt grubuna göre azalan santral alana giriş sayısı ve santral alanda geçirilen süre Imb+Flx, Imb+Mlt, Imb+Mlt+Flx gruplarında artmıştır. Ayrıca, zorunlu yüzme testinde Imb grubunda Cnt grubuna göre artan immobil zaman Imb+Flx, Imb+Mlt, Imb+Mlt+Flx gruplarında azalmıştır. Bunun yanı sıra pasif sakinme testine göre Imb grubunda Cnt grubuna göre artan duygusal öğrenme indeksinin Imb+Mlt ve Imb+Mlt+Flx gruplarında normale döndüğü gösterilmiştir. Bununla birlikte Imb grubunda artan MDA düzeyinin Imb+Flx, Imb+Mlt ve Imb+Mlt+Flx gruplarında anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Sonuç olarak melatoninin antidepresan, anksiyolitik ve antioksidan etkilerinin olduğu ve duygusal öğrenmeyi normalleştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışma ile, melatonin, fluoksetin ve kombinasyonlarının benzer etkili olduğu gösterilmiştir.*

**Anahtar Kelimeler:** *Anksiyete, depresyon, duygusal öğrenme, melatonin, stres*

## INTRODUCTION

Stress is defined as physical and pathological changes in the body that disrupt the organism's homeostasis and are assumed to be the major cause of many diseases [1]. We are exposed to stress in all aspects of everyday life, which seriously influences cognitive and emotional functions [2]. Chronic stress has been associated with a higher risk of a variety of physical and mental conditions, such as depression, anxiety, and cognitive impairment [3]. In addition, neurochemical and hormonal changes during stress have been related to oxidative stress [4]. Chronic stress has been reported to increase lipid peroxidation, nitrite levels, catalase activity, and glutathione levels in the brain, all related to oxidative stress [1].

The serotonergic system is one of the most important determinants of psychological state, emotions, sleep, and hunger-satiety [5]. Fluoxetine inhibits serotonin reuptake, increases serotonin levels in the synaptic gap, and produces antidepressant effects [6]. Fluoxetine is a potent antidepressant and anxiolytic agent that increases serotonin levels and protects brain cells from oxidative damage [7]. Melatonin is a circadian rhythm-related hormone synthesized from serotonin and released from the

pineal gland in the dark [6]. The antagonist effect of agomelatine on 5-HT<sub>2C</sub> serotonin receptor and agonist effect on MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub> melatonin receptors [8] has directed scientists to investigate the antidepressant effect profile of melatonin [6]. It has been suggested in studies that melatonin can prevent oxidative damage by various mechanisms [9, 10]. The use of drug combinations in treating cognitive and behavioral disorders stimulates various pharmacological pathways and allows the drugs to have additive or synergistic effects [11].

This study aimed to investigate the therapeutic effects of melatonin, fluoxetine, and their combinations on stress-induced pathways in mice. For this purpose, an OFT was used to determine locomotor activity and anxiety level. The effects of drugs on depression were investigated using an FST. Anxiety assessment was performed using an EPM test; emotional memory functions were measured using a PAT. MDA, a lipid peroxidation biomarker, was used to investigate brain oxidative damage and medications' effects on the damage.

## MATERIAL AND METHOD

### Experimental Animals

In the study, 48 male Balb/c mice weighing an average of 35-40 grams were obtained from Dicle University Health Sciences Application and Research Center (DÜSAM) with the approval of ethical committee number 16 dated 13.04.2016. The animals were maintained at a fixed room temperature (23±2°C) under a 12h light/ dark cycle. Tap water and food were provided ad libitum. Each mouse was tested individually and only once per day. The principles regarding "Protection of Animal Rights" were carefully followed during the study.

### Experimental Design

As in previous studies, the mice in the Imb groups underwent immobilization stress in cages too small to move around for 6 hours a day for 7 consecutive days [12]. Stressed mice were also restricted from food and water for 6 hours. Injections were made 30 minutes before the immobilization. Mlt (10 mg/kg, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) [13] was dissolved in 5% ethanol and diluted with saline, while Flx (20 mg/kg, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) [14] was dissolved in saline containing 5% ethanol (Table 1). All drugs and saline solution were administered ip with a total injection volume of 0.1 ml. Behavioral tests; OFT, FST, PAT, EPM, and HP tests were started on the eighth day. The mice were subjected to one test every day. After the behavioral tests, the mice were sacrificed with cervical decapitation under ether anesthesia, and their brain tissues were removed. MDA levels, an end product of lipid peroxidation, were measured in brain tissues.

**Table 1.** Experimental Design

Groups(n=6)	Immobilization (Imb)	Melatonin (10mg/kg)	Fluoxetine (20mg/kg)
1. Control (Cnt)			
2. Immobilization (Imb)	*		
3. Immobilization+Melatonin (Imb+Mlt)	*	*	
4. Immobilization+Fluoxetine (Imb+Flx)	*		*
5. Immobilization+Melatonin+Fluoxetine (Imb+Mlt+Flx)	*	*	*
6. Melatonin (Mlt)		*	
7. Fluoxetine (Flx)			*
8. Melatonin+Fluoxetine (Mlt+Flx)		*	*

### **Open field test (OFT)**

It is a test used to evaluate the spontaneous locomotor activities of subjects, such as exploring and walking. In addition, with the OFT, the anxiety caused by the conflict between the subjects' desire to explore and their inner fears due to staying in the open area can also be measured [15].

OFT; it is a 40x40x20cm dimension, illuminated by a light source, all surfaces in black color. The behavior of the subjects is recorded with the camera placed on the device and evaluated with the Ethovision XT 11.0 (Noldus Inf. Tech. Netherlands). Mice are left in the middle of the field, and their movements are recorded for 5 minutes. The duration of their stay in the central area and the number of entrances to this area, their total distance, and speeds in the open field were calculated.

### **Forced swimming test (FST)**

The FST is often used in depression research to study the effectiveness of antidepressants. This test was executed in a transparent cylinder tank filled with 30 cm water (diameter:20 cm, height: 50 cm). The escape efforts of the subjects who were left in the tank filled with water were monitored, and they were expected to remain immobile within a certain period (6 minutes) [16]. The fact that subjects gave up their efforts to get rid of the situation in a short time was interpreted in direct proportion to high depression levels. During the test, the temperature of the water in the tank was kept constant (24-26 ° C) to prevent additional stress on the subjects. And all the movements of the subjects were recorded with the help of a camera. After the experiment, the time spent mobile and immobile was analyzed using the Ethovision XT 11 (Noldus Inf. Tech. Netherlands) program.

### **Passive Avoidance test (PAT)**

The PAT is based on the subjects avoiding painful stimuli (mild foot shock). It is generally used in evaluating emotional memory in rodents [17].

The PAT apparatus consists of two sections (one bright, one dark, width-length-height: 11x12x20 cm) connected by an automatic sliding door. The bright section is illuminated with white light, while in the dark section, there is a steel grid with wires parallel to each other and connected to the shock device.

The PAT was performed in two consecutive days. On the first day (acquisition trial), the subjects were exposed to 2000 lux of light, and after waiting for 60 seconds to get used to the environment, the door between the two compartments was opened. The subjects waited to enter the dark section with their instincts, and the step-through latencies (time to escape from the light) were recorded. After the entrance, the automatic door was closed, and the subjects were given a 0.5 mA electric shock for 1 second with the help of the steel grid on the floor. After waiting for 3 seconds, the experiment was terminated. This test was repeated 24 hours later in order to evaluate the gain and recall in the memory of fear.

On the second day (retention trial), after the subjects were exposed to 2000 lux light for 30 seconds, the intermediate compartment was opened, and the step-through latencies (avoidance from darkness) were recorded. The difference between both step-through latency was accepted as the memory index. The mice that did not enter the dark section for five minutes were considered well remembered, and the experiment was terminated.

### **Elevated Plus Maze (EPM) test**

This test can evaluate the subjects' anxiety levels. Typically, subjects prefer to stay in closed arms and avoid open arms. Subjects with no anxiety demonstrate high environmental recognition behavior and spend more time in open arms [18].

The EPM has a 5x5 cm central area with two open and two closed arms, each 35 cm long. Its height from the ground is approximately 50 cm, and it is an entirely black-painted apparatus in the form of + (plus).

In our study, the subject's movements placed in the middle of the apparatus were recorded with a video camera for 5 minutes (300 seconds). The time spent in central, open, and closed arms and the number of entrances to central, open, and closed arms were calculated using the Ethovision XT 11 (Noldus Inf. Tech. Netherlands) program based on the video recordings.



### Hot Plate (HP) Test

HP test measured the pain (analgesic effect) reaction latencies. The test was carried out on a system with a metal floor at 52 °C and surrounded by a plexiglass cover (H26 cm, D19 cm). The experiment was terminated if the subjects licked their hind paws or jumped (max 30 seconds) [19].

### Biochemical Analysis of Lipid Peroxidation Levels

MDA is one of the lipid peroxidation products. Low pH and high-temperature MDA react with nucleophilic addition reaction with 2-thiobarbituric acid (TBA) and form a product that can measure the peak absorbance at 532 nm in the form of red fluorescent, 1: 2, MDA: TBA.

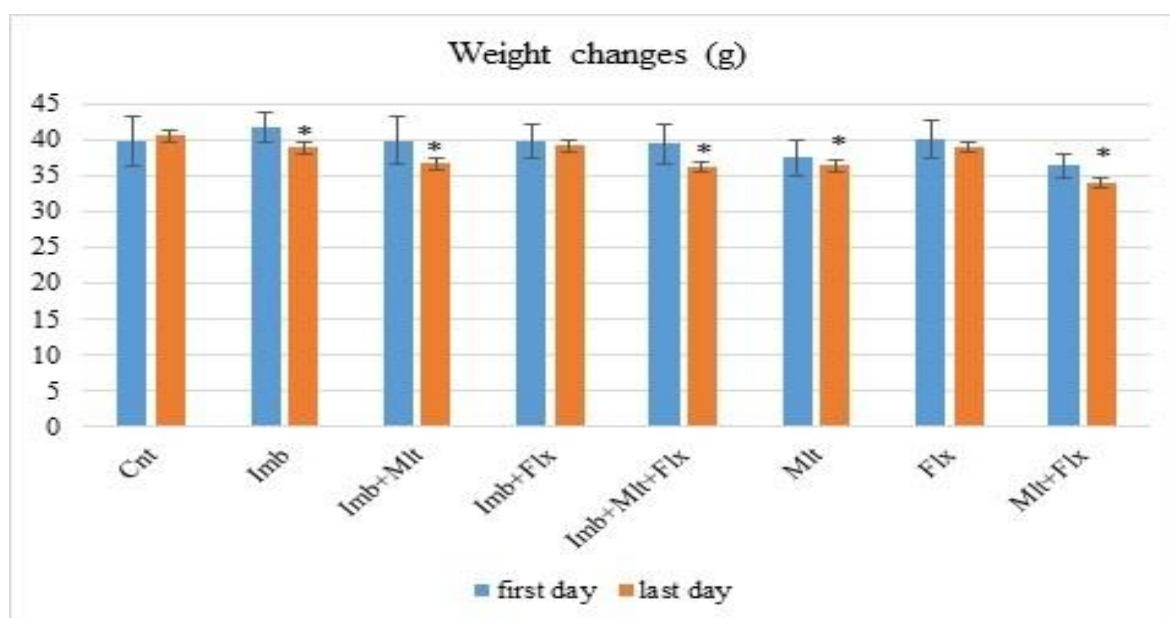
3 ml phosphoric acid (1%) and 1 ml TBA (0.6%) were added to 0.5 ml homogenate in the centrifuge tube, and the mixture was heated in a hot water bath for 45 minutes. After the mixture had cooled, 4 ml of n-butanol was added to the mixture and mixed on vortex for 1 min. The resulting mixture was centrifuged at 20,000 rpm for 20 minutes. The supernatant obtained after centrifugation was transferred to a new tube, and its absorbance at 532 nm was measured. 1,1,3,3-tetramethoxypropane was used as standard [20].

### Statistical Analysis:

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error. SPSS statistics program (Chicago, Ill. USA) was used to analyze of data obtained. Kruskal-Wallis test was used to compare multiple groups, and the Mann-Whitney U test was used to compare binary groups. The Wilcoxon test was used to compare weights between the first and final days.  $p < 0.05$  was accepted for statistical significance.

## RESULT AND DISCUSSION

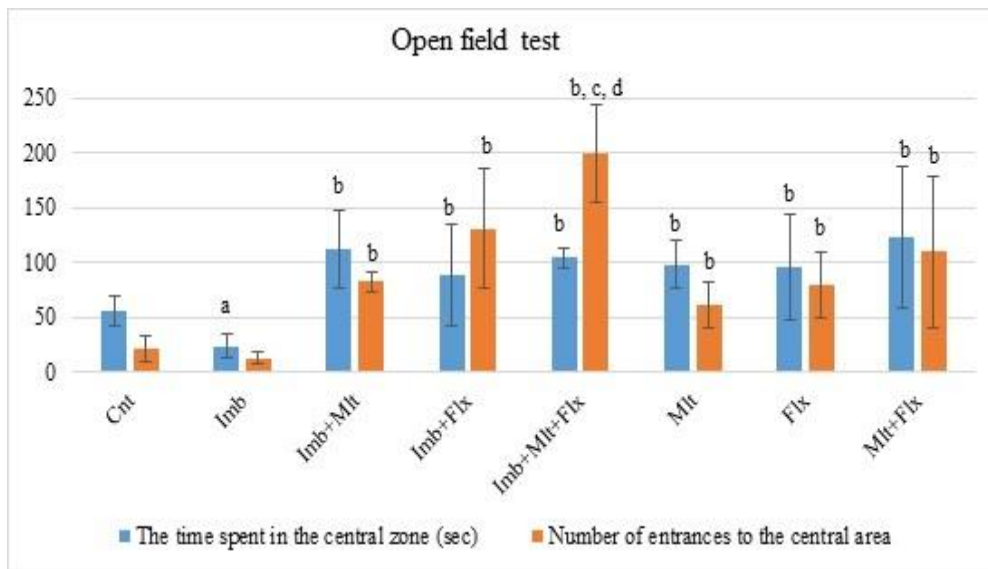
Weights of the subjects were measured before starting the experiment and after the behavioral tests ended. When the initial and final weights of the subjects were compared, the weights of the subjects in the Cnt group insignificantly increased. The subjects' weights in all other groups except Imb+Flx and Flx groups statistically decreased (Figure 1,  $p < 0.05$ ).



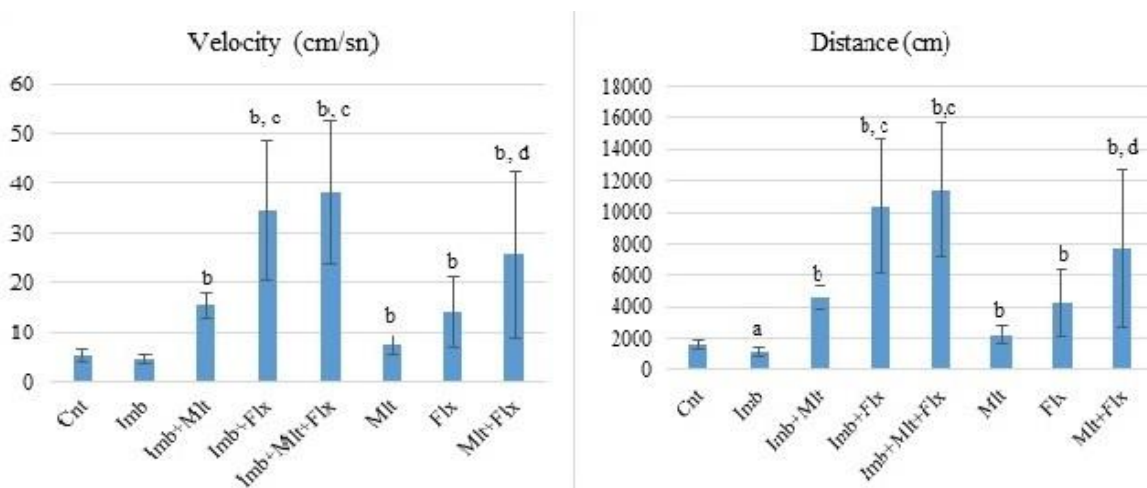
**Figure 1.** Weight changes compared with the initial and final weights of the subjects \*  $p < 0.05$

The time spent in the central area was lower in the Imb group compared to the Cnt group ( $p < 0.01$ , Figure 2). Compared to the Imb group, the time spent in the central zone and the number of entrances

to the central area were significantly higher in all drug-applied groups ( $p < 0.01$ , Figure 2). Moreover, the number of entrances to the central area was higher than in the Imb+Mlt+Flx group compared to Imb+Mlt and Imb+Flx groups ( $p < 0.05$ , Figure 2). The Imb group moved significantly less distance than the Cnt group ( $p < 0.01$ , Figure 3). Total distance and mean velocity in all drug-applied groups were significantly higher compared to the Imb group ( $p < 0.01$ , Figure 3). In addition, total distance and mean velocity in the Imb+Flx and Imb+Mlt+Flx groups were significantly higher compared to the Imb+Mlt group ( $p < 0.05$ , Figure 3). And also, total distance and mean velocity in the Mlt+Flx group were significantly higher compared to the Mlt group ( $p < 0.05$ , Figure 3).

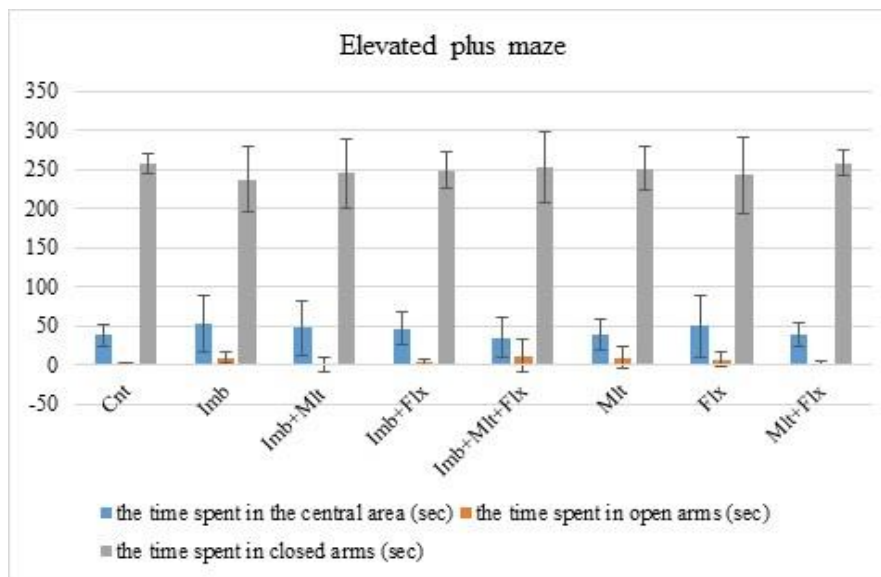


**Figure 2.** Open field test compared with Cnt <sup>a</sup> $p < 0.01$ , compared with Imb <sup>b</sup> $p < 0.01$ , compared with Imb+Mlt <sup>c</sup> $p < 0.05$ , compared with Imb+Flx <sup>d</sup> $p < 0.05$ .

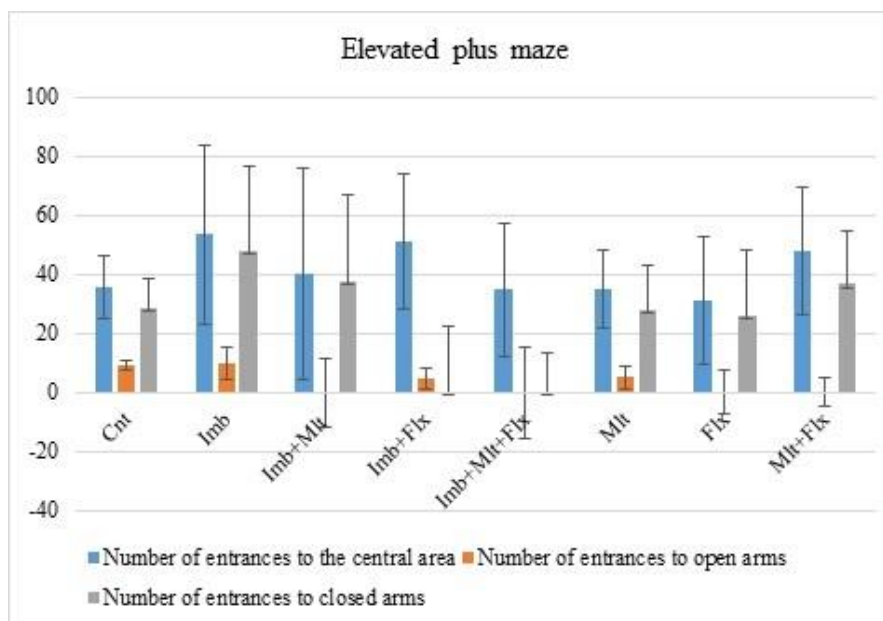


**Figure 3.** Open field test compared with Cnt <sup>a</sup> $p < 0.01$ , compared with Imb <sup>b</sup> $p < 0.01$ , compared with Imb+Mlt <sup>c</sup> $p < 0.05$ , compared with Mlt <sup>d</sup> $p < 0.05$

No statistically significant differences were obtained with the elevated plus maze test. (Figure 4, Figure 5)



**Figure 4.** Elevated plus maze



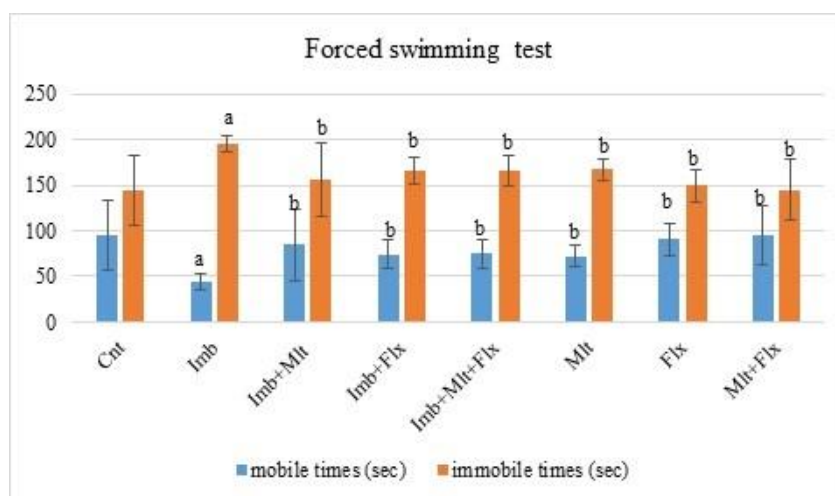
**Figure 5.** Elevated plus maze

The duration of immobilization was significantly higher in the Imb group compared to the Cnt group ( $p < 0.05$ , Figure 6). In the Imb+drug or only drug groups, the duration of immobilization was statistically lower than the Imb group ( $p < 0.01$ , Figure 6). On the other hand, while the mobilization duration in the Imb group was lower than the Cnt group ( $p < 0.05$ , Figure 6), the mobilization duration in the Imb+drug and only drug groups was higher than the Imb group ( $p < 0.01$ , Figure 6).

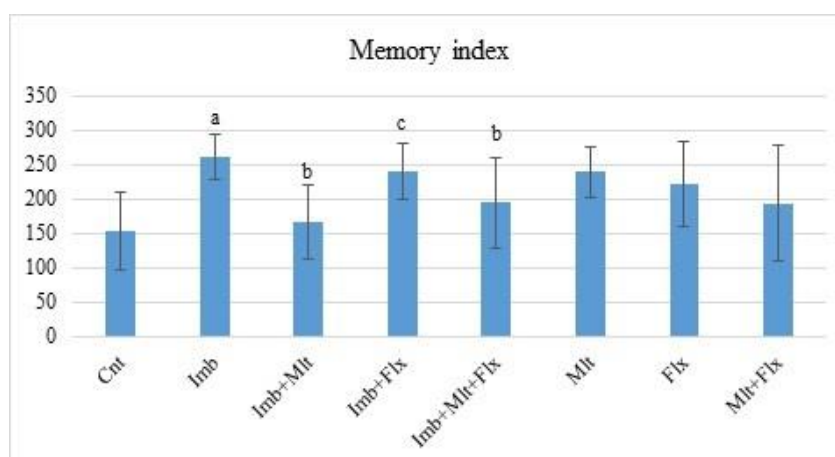
The memory index of the Imb group was significantly higher than the Cnt group ( $p < 0.01$ , Figure 7). The Imb+Mlt and Imb+Mlt+Flx groups' memory indexes were significantly lower than the Imb



group ( $p < 0.05$ , Figure 7). In addition, the Imb+Flx group memory index was significantly higher than the Imb+Mlt group ( $p < 0.05$ , Figure 7).



**Figure 6.** Forced swimming test result compared with Cnt, <sup>a</sup> $p < 0.05$ , compared with Imb <sup>b</sup> $p < 0.01$



**Figure 7.** Memory index of the subjects in the passive avoidance test compared with Cnt <sup>a</sup> $p < 0.01$ , compared with Imb <sup>b</sup> $p < 0.05$ , compared with Imb+Mlt <sup>c</sup> $p < 0.05$ .

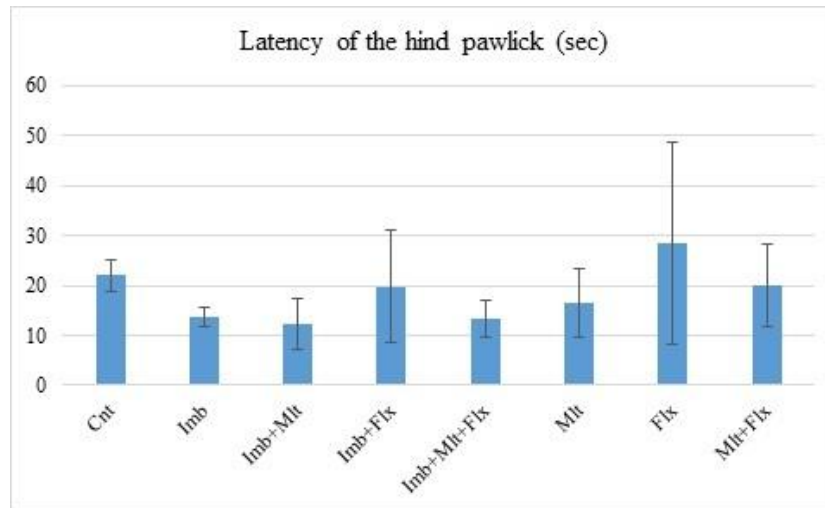
No statistically significant differences were obtained between the groups' pain reaction latencies ( $p > 0.05$ , Figure 8).

The MDA levels of the Imb group were significantly higher than the Cnt group ( $p < 0.01$ , Figure 9). Mlt, Flx, and Mlt+Flx treated groups' MDA levels were significantly lower than in the Imb group ( $p < 0.05$ , Figure 9).

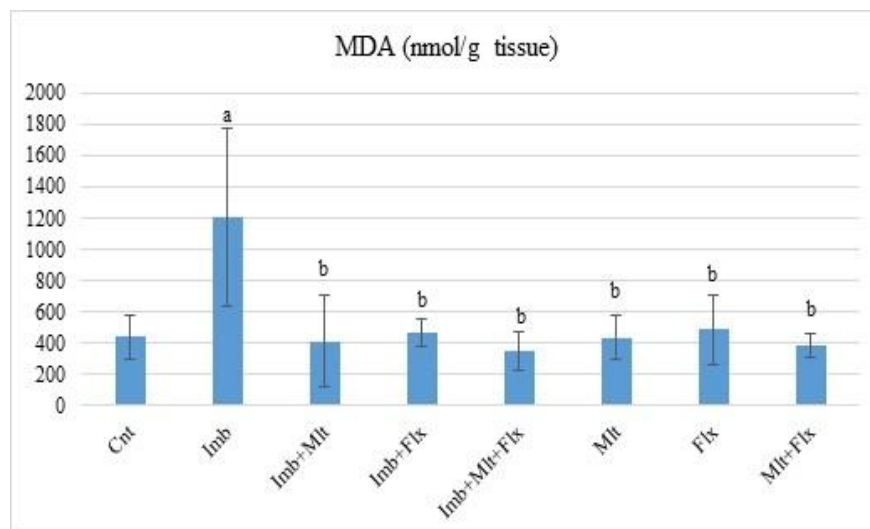
The immobilization stress model strongly mimics physical and psychological stress and is widely used to induce experimental stress [21]. This model has been demonstrated to cause anxiety, depression-like behavior, and changes in pain reaction, body weight, and locomotor activity. Furthermore, due to this procedure increased nitrite and MDA levels and decreased glutathione and adrenal ascorbic acid levels were reported [1, 3, 22].

In this study, the Imb group's weight gain was significantly lower than that of the Cnt group. While in a study, weight gain diminishes with the decrease in food intake in the immobilization stress groups [23], others did not exert a difference between the Imb and Cnt groups [6, 24].

The emotional memory index obtained from the PA tests revealed the Imb group had a significantly higher index than the Cnt group. While some researchers have reported that stress impairs learning and memory [25, 26], others have found that stress improves memory [27, 28]. According to Das et al. (2000), cognitive functions improved due to the suppression of brain acetylcholinesterase activity in the acute immobilization stress group; acetylcholinesterase activity was normalized with the development of adaptive processes in the cholinergic system in the case of continuous stress exposure [29].



**Figure 8.** Hot plate test result



**Figure 9.** MDA levels compared with Cnt <sup>a</sup> $p < 0.01$ , compared with Imb <sup>b</sup> $p < 0.05$

In studies conducted with the FST used to assess depression levels, the Imb group's immobilization duration was significantly higher than the Cnt group [6, 21]. Increased duration of immobilization in the FST is interpreted in favor of depression. In our study, compared to the Cnt group, the duration of immobilization in the FST was significantly higher in the Imb group.

According to OFT data, the Imb group spent less time in the center than the Cnt group, which was evaluated as an anxiety-like behavior in the Imb group. This study has demonstrated consistent results with other studies in which stress causes anxiety [30, 31]. No significant difference was observed between the Imb and the Cnt group regarding the number of entries to the central area and velocity.

However, in accordance with the literature, in the present study, the distance covered by the Imb group was significantly lower compared to the Cnt [22, 30]. This demonstrated that the Imb group's locomotor activity increased. On the other hand, in the previous study, according to the OFT data, no difference was reported between the Cnt group and the Imb group in terms of the time spent in the central area, the number of the entrance to the central area, and the distance they moved [6].

In the immobilization stress group, stress-related weight loss, anxiety, depression, emotional learning-memory enhancement, decreased locomotion, and increased lipid peroxidation levels were all successfully observed.

Fluoxetine was utilized to prevent stress-induced depression, anxiety-like behavior, and oxidative stress, which has been defined as an antidepressant, anxiolytic, and antioxidant in the literature [9,32].

Melatonin, released by the pineal gland, is reported to have significant functions in regulating circadian rhythm, immune system response, weight regulation, reproduction, tumor development suppression, jet-lag, and oxidation prevention [33]. It was reported that melatonin also has antidepressant and anxiolytic effects [10,34].

In the weight control we performed at the beginning and end of this study, the weight gain of the Imb, Imb+Mlt, Imb+Mlt+Flx, Mlt, and Mlt+Flx groups was considerably lowered. In other words, the Mlt treatment reduced weight gain in all groups, and the weight gain reduction was higher in the Mlt group than in the Imb group, while the difference was not statistically significant. A previous study reported that there is no relationship between melatonin and weight gain [6], while some other studies reported that melatonin causes weight gain [35] or weight loss [22].

In our study, the memory index data in the Imb+Mlt and Imb+Mlt+Flx groups were considerably lower than in the Imb group with the PAT. These results show that emotional memory, which increases with stress, decreases with Mlt. A recent study reported that melatonin enhanced impaired spatial learning and working memory by reducing oxidative stress [36]. Another research concluded that the level of melatonin decreases in the early stages of Alzheimer's disease and that melatonin treatment can improve cognitive abilities in these patients [37]. On the other hand, genetic deletion of melatonin receptors has been reported to improve cognitive and motor performance [38].

In this study, the duration of immobility on the FST was significantly lower in the Imb+Mlt, Imb+Flx, and Imb+Mlt+Flx groups than in the Imb group. The incidence of depression-like behavior was lower in all the drug-applied groups than in the Cnt group. It was noted that getting fluoxetine and melatonin together had no additional benefit. Numerous studies have demonstrated that melatonin has an antidepressant effect [39, 40]. In the previous study, similar to this study, in the FST, the duration of mobility in the Imb group was lower compared to the Cnt group, and the duration of mobility in the Imb+Mlt, Imb+Flx, Imb+Mlt+Flx groups was higher compared to the Imb group. However, Mlt+Flx was found to be more effective than the application of these drugs alone in immobilization stress [6].

The OF and the EPM tests were used to assess anxiety. While the EPM test yielded no significant results, in comparison to the Imb group, the time spent in the center area and also the number of entrances to the central area was higher in the Imb+Mlt, Imb+Flx, and Imb+Mlt+Flx groups with the OFT. These results indicate that increased anxiety levels with stress application can be ameliorated with the mentioned drugs. However, giving the drugs alone or in combination provided no benefit. A study reported that melatonin showed anxiolytic effects by increasing the number of open arm entrances and duration in the EPM test [41].

MDA is a marker of oxidative stress-mediated lipid peroxidation in the central nervous system and other organs. It was revealed that lipid peroxidation, which increases with stress, affects depression, anxiety, and learning-memory pathology [42]. In a previous study, it was also reported that melatonin pretreatment reduced lipid peroxidation [43]. Our study displayed that MDA levels, which increased with immobilization stress, decreased significantly with Mlt, Flx, and Mlt+Flx treatments. However, the combined drugs did not provide more benefits than using them alone.

The immobilization stress model was successfully carried out in this study. It was observed that the Mlt, Flx, and Mlt+Flx significantly reduced depression, anxiety, and MDA levels in immobilization stress group. In addition, it was observed that the Mlt, Flx, and Mlt+Flx significantly reduced depression, anxiety, and MDA levels in the immobilization stress group. In

addition, the improved emotional learning memory in the Imb group returned to baseline with the Mlt and Mlt+Flx applications. According to these results, no significant difference was observed between the administration of melatonin, fluoxetine and their combinations.

In conclusion, our study demonstrated that melatonin, fluoxetine, and their combinations have beneficial effects on stress-induced alterations in behavior and oxidative parameters.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Dicle University Scientific Research Projects (Project No: TIP.16.011) for financial support.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: M.İ.Ç.; Design: M.İ.Ç.; Control: M.İ.Ç., M.E.; Sources: M.İ.Ç.; Materials: M.İ.Ç., M.E, L.E.; Data Collection and/or Processing: M.İ.Ç., E.U.; Analysis and/or Interpretation: M.İ.Ç., M.E., E.U., İ.K., L.E.; Literature Review: M.İ.Ç.; Manuscript Writing: M.İ.Ç., M.E., E.U., İ.K., L.E.; Critical Review: M.İ.Ç., M.E., E.U., İ.K.; Other: -

## CONFLICT OF INTEREST

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

## ETHICS COMMITTEE APPROVAL

All experiment procedures and protocols used in the study were approved by the Dicle University Local Committee on Animal Research Ethics (No: 16, dated 13.04.2016).

## REFERENCES

1. Sahin, E., Gumuslu, S. (2007). Immobilization stress in rat tissues: alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 144(4), 342-347. [\[CrossRef\]](#)
2. Kang, Y.J., Sim, Y.B., Park, S.H., Sharma, N., Suh, H.W. (2015). Involvement of alpha(2)-adrenergic receptor in the regulation of the blood glucose level induced by immobilization stress. *Archives of Pharmacal Research*, 38(5), 921-929. [\[CrossRef\]](#)
3. Chiba, S., Numakawa, T., Ninomiya, M., Richards, M.C., Wakabayashi, C., Kunugi, H. (2012). Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, 39(1), 112-119. [\[CrossRef\]](#)
4. Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M., Farkhondeh, T., Samini, F. (2017). Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 87, 223-229. [\[CrossRef\]](#)
5. Azouzi, S., Santuz, H., Morandat, S., Pereira, C., Cote, F., Hermine, O., El Kirat, K., Colin, Y., Le Van Kim, C., Etchebest, C., Amireault, P. (2017). Antioxidant and membrane binding properties of serotonin protect lipids from oxidation. *Biophysical Journal*, 112(9), 1863-1873. [\[CrossRef\]](#)
6. Li, K., Shen, S., Ji, Y.T., Li, X.Y., Zhang, L.S., Wang, X.D. (2018). Melatonin augments the effects of fluoxetine on depression-like behavior and hippocampal BDNF-TrkB signaling. *Neuroscience Bulletin*, 34(2), 303-311. [\[CrossRef\]](#)
7. Avitsur, R., Grinshpahet, R., Goren, N., Weinstein, I., Kirshenboim, O., Chlebowski, N. (2016). Prenatal SSRI alters the hormonal and behavioral responses to stress in female mice: Possible role for glucocorticoid resistance. *Hormones and Behavior*, 84, 41-49. [\[CrossRef\]](#)
8. Tchekalarova, J., Stoyanova, T., Ilieva, K., Mitreva, R., Atanasova, M. (2018). Agomelatine treatment corrects symptoms of depression and anxiety by restoring the disrupted melatonin circadian rhythms of rats exposed to chronic constant light. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 171, 1-9. [\[CrossRef\]](#)
9. Rebai, R., Jasmin, L., Boudah, A. (2017). The antidepressant effect of melatonin and fluoxetine in diabetic rats is associated with a reduction of the oxidative stress in the prefrontal and hippocampal cortices. *Brain Research Bulletin*, 134, 142-150. [\[CrossRef\]](#)

10. Ergenc, M., Ozacmak, H.S., Turan, I., Ozacmak, V.H. (2022). Melatonin reverses depressive and anxiety like-behaviours induced by diabetes: involvement of oxidative stress, age, rage and S100B levels in the hippocampus and prefrontal cortex of rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 128, 402-410. [\[CrossRef\]](#)
11. Roni, M.A., Rahman, S. (2015) Effects of lobeline and reboxetine, fluoxetine, or bupropion combination on depression-like behaviors in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 139(Pt A), 1-6. [\[CrossRef\]](#)
12. Dhir, A., Padi, S.S., Naidu, P.S., Kulkarni, S.K. (2006). Protective effect of naproxen (non-selective COX-inhibitor) or rofecoxib (selective COX-2 inhibitor) on immobilization stress-induced behavioral and biochemical alterations in mice. *European Journal of Pharmacology*, 535(1-3), 192-198. [\[CrossRef\]](#)
13. Taniguti, E.H., Ferreira, Y.S., Stupp, I., Fraga-Junior, E.B., Mendonça, C.B., Rossi, F.L., Ynoue, H.N., Doneda, D.L., Lopes, L., Lima, E., Buss, Z.S., Vandresen-Filho, S. (2018). Neuroprotective effect of melatonin against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. *Physiology & Behavior*, 188, 270-275. [\[CrossRef\]](#)
14. 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. [\[CrossRef\]](#)
15. Kumar, N., Singh, N., Jaggi, A.S. (2012). Anti-stress effects of cilnidipine and nimodipine in immobilization subjected mice. *Physiology and Behavior*, 105(5), 1148-1155. [\[CrossRef\]](#)
16. Castagne, V., Moser, P., Roux, S., Porsolt, R.D. (2011). Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Current Protocols in Neuroscience*, Chapter 8, Unit 8 10A. [\[CrossRef\]](#)
17. McGaugh, J.L., Cahill, L., Roozendaal, B. (1996). Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), 13508-13514. [\[CrossRef\]](#)
18. Walf, A.A., Frye, C.A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2(2), 322-328. [\[CrossRef\]](#)
19. Bannon, A.W., Malmberg, A.B. (2007). Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Current Protocols in Neuroscience*, 41, 8.9.1-8.9.16. [\[CrossRef\]](#)
20. Pompella, A., Maellaro, E., Casini, A.F., Ferrali, M., Ciccoli, L., Comporti, M. (1987). Measurement of lipid peroxidation in vivo: a comparison of different procedures. *Lipids*, 22(3), 206-211. [\[CrossRef\]](#)
21. Samad, N., Saleem, A., Yasmin, F., Shehzad, M.A. (2018). Quercetin protects against stress-induced anxiety- and depression-like behavior and improves memory in male mice. *Physiological Research*, 67(5), 795-808. [\[CrossRef\]](#)
22. Kumar, A., Kaur, G., Rinwa, P. (2014). Buspirone along with melatonin attenuates oxidative damage and anxiety-like behavior in a mouse model of immobilization stress. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(8), 582-589. [\[CrossRef\]](#)
23. Sakhri, F.Z., Adachi, N., Zerizer, S., Ohashi, Y., Ikemoto, H., Tsukada, M., Kabouche, Z., Hisamitsu, T., Sunagawa, M. (2021). Behavioral and neurological improvement by *Cydonia oblonga* fruit extract in chronic immobilization stress rats. *Phytotherapy Research*, 35(4), 2074-2084. [\[CrossRef\]](#)
24. Macedo, I.C., Rozisky, J.R., Oliveira, C., Oliveira, C.M., Laste, G., Nonose, Y., Santos, V.S., Marquez, P.R., Ribeiro, M.F.M., Caumo, W., Torres, I.L.S. (2015). Chronic stress associated with hypercaloric diet changes the hippocampal BDNF levels in male Wistar rats. *Neuropeptides*, 51, 75-81. [\[CrossRef\]](#)
25. Faucher, P., Huguet, C., Mons, N., Micheau, J. (2022). Acute pre-learning stress selectively impairs hippocampus-dependent fear memory consolidation: Behavioral and molecular evidence. *Neurobiology of Learning and Memory*, 188, 107585. [\[CrossRef\]](#)
26. Woo, H., Hong, C.J., Jung, S., Choe, S., Yu, S.W. (2018). Chronic restraint stress induces hippocampal memory deficits by impairing insulin signaling. *Molecular Brain*, 11(1), 37. [\[CrossRef\]](#)
27. Kumar, R.S., Narayanan, S.N., Kumar, N., Nayak, S. (2018). Exposure to enriched environment restores altered passive avoidance learning and ameliorates hippocampal injury in male albino wistar rats subjected to chronic restraint stress. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 8(4), 231-236. [\[CrossRef\]](#)
28. Rajbhandari, A.K., Gonzalez, S.T., Fanselow, M.S. (2018). Stress-enhanced fear learning, a robust rodent model of post-traumatic stress disorder. *Journal of Visualized Experiments*, 140, 58306. [\[CrossRef\]](#)
29. Das, A., Kapoor, K., Sayeepriyadarshini, A.T., Dikshit, M., Palit, G., Nath, C. (2000). Immobilization stress-induced changes in brain acetylcholinesterase activity and cognitive function in mice. *Pharmacological Research*, 42(3), 213-217. [\[CrossRef\]](#)



30. Gomaa, A.M., Galal, H.M., Abou-Elgait, A.T. (2017). Neuroprotective effects of melatonin administration against chronic immobilization stress in rats. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 9(2), 16-27.
31. Banagozar Mohammadi, A., Torbati, M., Farajdokht, F., Sadigh-Eteghad, S., Fazljou, S.M.B., Vatandoust, S.M., Golzari, S.E.J., Mahmoudi, J. (2019). Sericin alleviates restraint stress induced depressive- and anxiety-like behaviors via modulation of oxidative stress, neuroinflammation and apoptosis in the prefrontal cortex and hippocampus. *Brain Research*, 1715, 47-56. [\[CrossRef\]](#)
32. Mendez-David, I., Tritschler, L., Ali, Z.E., Damiens, M.H., Pallardy, M., David, D.J., Kerdine-Römer, S., Gardier, A.M. (2015). Nrf2-signaling and BDNF: A new target for the antidepressant-like activity of chronic fluoxetine treatment in a mouse model of anxiety/depression. *Neuroscience Letters*, 597, 121-126. [\[CrossRef\]](#)
33. Samanta, S. (2022). Physiological and pharmacological perspectives of melatonin. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 128, 1346-1367. [\[CrossRef\]](#)
34. Nie, L., Wei, G., Peng, S., Qu, Z., Yang, Y., Yang, Q., Huang, X., Liu, J., Zhuang, Z., Yang, X. (2017). Melatonin ameliorates anxiety and depression-like behaviors and modulates proteomic changes in triple transgenic mice of Alzheimer's disease. *Biofactors*, 43(4), 593-611. [\[CrossRef\]](#)
35. Tamura, I., Tamura, H., Kawamoto-Jozaki, M., Doi-Tanaka, Y., Takagi, H., Shirafuta, Y., Mihara, Y., Maekawa, R., Taketani, T., Sato, S., Sugino, N. (2021). Long-term melatonin treatment attenuates body weight gain with aging in female mice. *Journal of Endocrinology*, 251(1), 15-25. [\[CrossRef\]](#)
36. Lamtai, M., Azirar, S., Zghari, O., Ouakki, S., El Hessni, A., Mesfioui, A., Ouichou, A. (2021). Melatonin ameliorates cadmium-induced affective and cognitive impairments and hippocampal oxidative stress in rat. *Biological Trace Element Research*, 199(4), 1445-1455. [\[CrossRef\]](#)
37. Lin, C. H., Chiu, C.C., Lane, H.Y. (2021). Trough melatonin levels differ between early and late phases of Alzheimer Disease. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 19(1), 135-144. [\[CrossRef\]](#)
38. O'Neal-Moffitt, G., Pilli, J., Kumar, S.S., Olcese, J. (2014). Genetic deletion of MT(1)/MT(2) melatonin receptors enhances murine cognitive and motor performance. *Neuroscience*, 277, 506-521. [\[CrossRef\]](#)
39. Stefanovic, B., Spasojevic, N., Jovanovic, P., Jasnic, N., Djordjevic, J., Dronjak, S. (2016). Melatonin mediated antidepressant-like effect in the hippocampus of chronic stress-induced depression rats: Regulating vesicular monoamine transporter 2 and monoamine oxidase A levels. *European Neuropsychopharmacology*, 26(10), 1629-1637. [\[CrossRef\]](#)
40. Sun, X., Wang, M., Wang, Y., Lian, B., Sun, H., Wang, G., Li, Q., Sun, L. (2017). Melatonin produces a rapid onset and prolonged efficacy in reducing depression-like behaviors in adult rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *Neuroscience Letters*, 642, 129-135. [\[CrossRef\]](#)
41. Spasojevic, N., Stefanovic, B., Jovanovic, P., Dronjak, S. (2016). Anxiety and hyperlocomotion induced by chronic unpredictable mild stress can be moderated with melatonin treatment. *Folia Biologica (Praha)*, 62(6), 250-257.
42. Karimi, S.A., Salehi, I., Shykhi, T., Zare, S., Komaki, A. (2019). Effects of exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields on spatial and passive avoidance learning and memory, anxiety-like behavior and oxidative stress in male rats. *Behavioral Brain Research*, 359, 630-638. [\[CrossRef\]](#)
43. Pal, R., Gulati, K., Banerjee, B.D., Ray, A. (2016). Pharmacological and biochemical studies on the protective effects of melatonin during stress-induced behavioral and immunological changes in relation to oxidative stress in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 94(3), 296-301. [\[CrossRef\]](#)



## CELL INCORPORATION STUDY OF [<sup>99m</sup>Tc]Tc-NAB-PACLITAXEL ON HUMAN COLORECTAL ADENOCARCINOMA CELL LINE

[<sup>99m</sup>Tc]Tc-NAB-PAKLİTAKSEL'İN İNSAN KOLOREKTAL ADENOKARSİNOMA HÜCRE HATTI ÜZERİNDE HÜCRE BAĞLANMA ÇALIŞMASI

Meliha EKİNCİ<sup>1\*</sup> , Derya İLEM-ÖZDEMİR<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Ege University, Faculty of Pharmacy, Department of Radiopharmacy, 35040, İzmir, Turkey

### ABSTRACT

**Objective:** The development of new radiopharmaceuticals capable of specifically imaging cancer is an important research area. For this reason, the aim of this study is to investigate cell binding of novel developed nanoradiopharmaceutical (<sup>99m</sup>Tc]Tc-nab-PTX) on HT-29 cell line (human colorectal adenocarcinoma cells).

**Material and Method:** In this study, nab-PTX was labeled with [<sup>99m</sup>Tc]Tc, and labeling efficiency and in vitro stability were investigated by radioactive thin layer chromatography (RTLC). Then, cell incorporation of [<sup>99m</sup>Tc]Tc-nab-PTX was performed using HT-29 cell line.

**Result and Discussion:** According to obtained results, nab-PTX was labeled with high radiochemical purity (>99%). The [<sup>99m</sup>Tc]Tc-nab-PTX was found to be stable in saline for 6-h, and in cell medium up to 2-h. It was determined that [<sup>99m</sup>Tc]Tc-nab-PTX had a greater cell binding activity on HT-29 cells than R/H-[<sup>99m</sup>Tc]NaTcO<sub>4</sub> at 30 min. The results were found to be promising for future in vivo studies with [<sup>99m</sup>Tc]Tc-nab-PTX.

**Keywords:** HT29 cell line, nab-paclitaxel, radiolabeling, technetium-99m

### ÖZ

**Amaç:** Spesifik olarak kanseri görüntüleyebilen yeni radyofarmasötiklerin geliştirilmesi önemli bir araştırma alanıdır. Bu nedenle bu çalışmanın amacı, yeni geliştirilen nanoradyofarmasötüğün (<sup>99m</sup>Tc]Tc-nab-PTX) HT-29 hücre hattına (insan kolorektal adenokarsinom hücreleri) hücre bağlanmasını araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada, nab-PTX [<sup>99m</sup>Tc]Tc ile işaretlenmiş ve işaretleme etkinliği ve in vitro stabilitesi radyoaktif ince tabaka kromatografisi (RTLC) ile araştırılmıştır. Daha sonra, [<sup>99m</sup>Tc]Tc-nab-PTX'in hücre bağlanması, HT-29 hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

\* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Meliha Ekinci  
e-mail / e-posta: melihaekinci90@gmail.com, Phone / Tel.: +902323113282

**Sonuç ve Tartışma:** *Elde edilen sonuçlara göre, nab-PTX yüksek radyokimyasal saflıkla (>%99) radyoişaretlenmiştir. [<sup>99m</sup>Tc]Tc-nab-PTX'in oda sıcaklığında 6 saate kadar ve hücre ortamında 2 saate kadar stabil olduğu bulunmuştur. [<sup>99m</sup>Tc]Tc-nab-PTX'in HT-29 hücreleri üzerinde 30. dakikada R/H-[<sup>99m</sup>Tc]NaTcO<sub>4</sub>'ten daha yüksek bir hücre bağlama aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Sonuçların [<sup>99m</sup>Tc]Tc-nab-PTX ile gelecek in vivo çalışmalar için umut verici olduğu bulunmuştur.*

**Anahtar Kelimeler:** *HT29 hücre hattı, nab-paklitaksel, radyoişaretleme, teknesyum-99m*

## INTRODUCTION

Cancer has long been one of the world's top causes of death [1,2]. According to 2020 data, a total of 19.3 million new cancer cases developed in the world, and 10.0 million people died due to cancer [3]. Cancer can be defined simply as uncontrolled cell proliferation. Although uncontrolled proliferation is the main feature, the cancer cell also has other biological characteristics. These include avoiding contact inhibition in cell cultures, not requiring external stimuli to divide, insensitivity to proliferation suppressive signals, avoiding apoptosis, stimulating angiogenesis and metastasis. Although there are many different types of cancer, they all start with the out-of-control proliferation of abnormal cells. If left untreated, it can cause serious illness and even death [4].

The most common types of cancer are lung, breast, and colorectal cancers. Among them, colorectal cancers are the 4<sup>th</sup> most common cancer in women and 6<sup>th</sup> in men globally [3], while their incidence in both genders is 3<sup>rd</sup> in our country [5]. It usually gives symptoms as the disease progresses. Therefore, early diagnosis is very important for colorectal cancer. Detection and effective treatment of cancer at early levels significantly reduces the cost and duration of treatment, and the risk of mortality and morbidity. Anatomical imaging techniques are not sufficient for imaging in the initial stage of this disease, as they rely on morphological changes. Since scintigraphic imaging is a non-invasive imaging technique based on the detection of physiological changes, it allows diagnosis at an early stage [6-9]. Therefore, it is critical to develop radiopharmaceuticals that can detect physiological changes before anatomical changes occur [10]. With nuclear medicine imaging techniques, both the diagnosis of the disease and its prevalence, or in other words, at what stage is determined [7,11,12].

Radiopharmaceuticals are defined as radioactive drugs used in nuclear medicine, consisting of two parts, a radionuclide, and a pharmaceutical part, that do not cause a pharmacological response in the patient, and are used for diagnosis and treatment. As the target/non-target tissue uptake of radiopharmaceuticals increases, so does the diagnosis and treatment efficiency. Therefore, by targeting the radiopharmaceutical, it is aimed to reduce the radiation damage outside the target tissue and to increase the image quality obtained [13].

Ideal radionuclide to be used in diagnosis should emit pure gamma rays, have an energy between 100-250 KeV, be easily available, reasonably priced, suitable for use with effective half-life, high target/non-target ratio, sterile, nonpyrogenic, isotonic, and isohydric. Considering all these features, [<sup>99m</sup>Tc]Tc is the most ideal of the radioisotopes used for diagnostic purposes in nuclear medicine. The physical half-life of [<sup>99m</sup>Tc]Tc is 6-h, and [<sup>99m</sup>Tc]Tc only emits gamma radiation with an energy of 140 KeV, does not emit beta particles and has a short half-life, so the radiation dose to which the patient is exposed is very low [14-16].

Nanoparticle albumin bound paclitaxel, also known nab-PTX, is an antineoplastic agent effective against many cancer types including breast, ovarian, colon, pancreas, and non-small cell lung cancers [17-19]. nab-PTX has been shown to be effective, even in individuals with poor prognostic factors and aggressive disease characteristics [20], thus nab-technology a focus of interest made for anti-cancer drug delivery systems [21]. In preclinical research, nab-PTX demonstrated anticancer effect as a single agent and synergistic activity when combined with other chemotherapeutic agents [22,23].

Albumin is a drug carrier in the anticancer drug delivery system, and also has the capacity to actively target tumors, and nab-PTX, which has 130 nm of particle size, is a new form of solvent-free albumin-bound PTX [24,25]. It is prepared in a nanoparticle colloidal suspension by high pressure homogenization of PTX in the presence of serum albumin [25]. The difference of nab-PTX from PTX is that PTX requires the use of solvents such as Cremophor EL and Colliphor EL in the treatment. These



solvents used in the solvent-based (sb) PTX formulation are associated with extremely serious hypersensitivity reactions. To prevent this situation with sb-PTX, patients are generally treated with antihistamines and corticosteroids. Also, some studies have shown that Colliphor EL can retain PTX in solvent micelles, so the drug is less available to enter tumors, and clinical efficacy of PTX reduces [26-28].

Furthermore, compared to sb-PTX, nab-PTX has several practical advantages such as delivering significantly higher doses of PTX over a shorter infusion time (about 30-min), and eliminating the require for premedication to prevent hypersensitivity reactions. Also, nab-PTX can better transport of PTX between endothelial cells than sb-PTX [24]. Since nab-PTX contains albumin in its formulation, it is presumed that the drug utilizes endogenous albumin transport routes, including receptor-mediated transcytosis, to enter tumors by crossing endothelial cell monolayers, eliminating the effect of Cremophor-EL on PTX pharmacokinetics [24,29]. In a preclinical study, four times more nab-PTX transported between endothelial cells than sb-PTX was found [24]. Due to leaky vascularity around tumors, albumin-bound molecules like albumin or nab-PTX are also able to escape from the bloodstream through spaces between endothelial cells, finding a pathway in the tumor microenvironment *via* increased permeability and retention effect [30].

The aim of this study is to determine cell incorporation of novel developed radiopharmaceutical ( $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-nab-PTX}$ ) on HT-29 cell line (human colorectal adenocarcinoma cell line). For this aim, nab-PTX was labeled with  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ , and radiochemical purity (RP) and *in vitro* stability (in cell medium) were investigated *via* radio-thin layer chromatography (R-TLC). Then, cell incorporation of  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-nab-PTX}$  was studied.

## MATERIAL AND METHOD

### Material

Panacea Biotec (India) provided nab-PTX. Sigma-Aldrich (USA) provided stannous chloride.  $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$  was provided from the Nuclear Medicine Department of Ege University (Turkey). Cell culture supplements were obtained from Gibco Invitrogen (Grand Island, NY). The HT-29 cells were purchased from the American Type Culture Collection.

### Preparation of $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-nab-PTX}$

nab-PTX was previously radiolabeled with  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$  by our research team [31]. Briefly, 0.5 mg nab-PTX was dispersed in 1 ml of saline (SF). To this solution,  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  reducing agent (stannous chloride solution in distilled water) was added. Then, to radiolabel nab-PTX, 37 MBq (0.1 ml)  $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$  was added to the system. The resulting radiolabeled complex was shaken for 45 s, and incubated for 15-min. The RP of  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-nab-PTX}$  was analyzed by R-TLC.

### Quality Control Study of $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-nab-PTX}$

In order to determine the RP of nab-PTX, R-TLC was done with ITLC-SG chromatography paper using 3-5  $\mu\text{l}$  of  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-nab-PTX}$  and acetone as mobile phase. The radioactivity of the papers was scanned *via* a R-TLC device (Bioscan AR 2000) up to 6-h.

### *In vitro* Stability of $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-nab-PTX}$

For *in vitro* stability of  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-nab-PTX}$  in McCoy's 5A containing 10% fetal bovine serum (FBS) (cell media), 0.1 ml of  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-nab-PTX}$  was added to cell medium (0.4 ml). The complex was incubated in an incubator at  $37^\circ\text{C}$  and RP of  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-nab-PTX}$  were performed up to 2-h.

### Cell Culture Study

The HT-29 cells were used for cell incorporation studies. McCoy's 5A containing 10% FBS was used as cell media. Cells were seeded  $1 \times 10^6$  cells on plates under 90% humidity and 5%  $\text{CO}_2$  at  $37^\circ\text{C}$ .

### Cell Incorporation Study of $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-nab-PTX}$

18.5 MBq of  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-nab-PTX}$  and R/H- $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$  (as control) were treated with HT-29

cells in six well plates for 2-h at 37°C. The radioactive cell culture media was collected at determined times. The HT-29 cells were trypsinized with 0.5 ml of trypsin to remove the cells. 0.75 ml of cell medium and 0.75 ml of phosphate-buffered were also added to the cells, and the system was centrifuged at 1.200 rpm for 3-min. The activities both cells and cell medium were counted using a gamma counter (Sesa Uniscaller), separately. The radioactivity of cells (%) was determined from the following equation (Eq. 1):

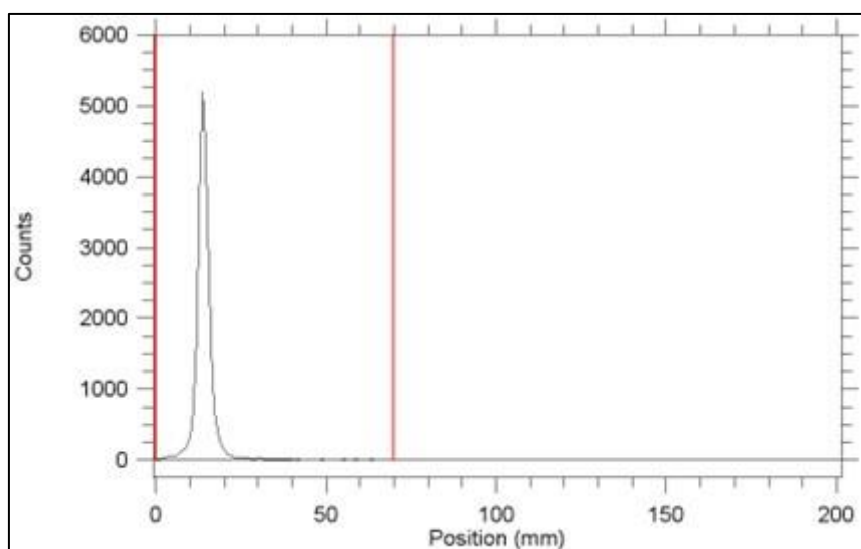
$$\text{Radioactivity of HT-29 cells (\%)} = (\text{Radioactivity of HT-29 cells} / \text{Total counted radioactivity}) \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

### Statistical Analysis

The *in vitro* results were calculated using Microsoft Excel, reported as the mean  $\pm$  standard error, and studies were performed three times. The statistical significance was assessed using the t test. Differences that were significant at the 95% level of confidence ( $p > 0.05$ ) were noted.

## RESULT AND DISCUSSION

In this study, nab-PTX was successfully radiolabeled with [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc. The RP of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-nab-PTX was evaluated by R-TLC studies for 6-h. ITLC-SG chromatography paper and acetone were used to determine the amounts of radioactive contaminant (free [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc). Using these systems, the R-TLC chromatogram of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-nab-PTX was presented in Figure 1.



**Figure 1.** R-TLC chromatogram of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-nab-PTX in acetone as mobile phase.

[ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-labeled compounds consist of a targeting vector linked to a [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-ligand complex which is carried [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc to a specific site. [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-labeled compounds include nanoparticles, blood cellular elements, and receptor-specific transporters, such as peptides and antibodies [32]. In general, labeling of the prepared nanoparticles might be performed (a) by surface sorption of the radionuclide to the surface of the nanoparticle directly, (b) intrinsic encapsulation of the radionuclide into the core of the nanoparticle during the synthesis, (c) chelation of radionuclide by ligands (mostly polydentate, e.g., DTPA (Diethylenetriamine pentaacetate), DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid), and NOTA (1,4,7-triazacyclononane- $N,N',N''$ -trisacetic acid) derived analogs) directly attached or linker spaced on the surface of the nanoparticle. Several factors influence the labeling yield and the stability of the complex, such as the amount of reducing agent and ligand, pH, and temperature. The chemical groups suitable for direct radiolabeling by chelating [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc radionuclide are  $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{PO}_4$ ,  $-\text{P}_2\text{O}_7^-$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SOOH}$ ,  $-\text{SOONH}$ ,  $-\text{SOONH}_2$ ,  $-\text{OCH}_3$ . By using these chemical groups,

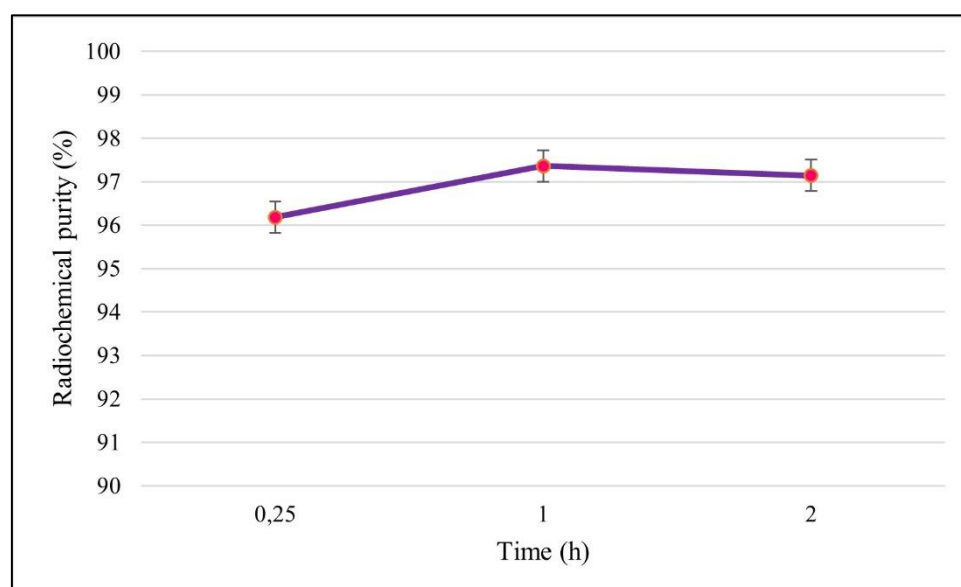
radiolabeling can be done directly with [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc and through different chelate groups [33].

According to the results, the RP of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-nab-PTX was found greater than 99%. Over the experimental period, [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-nab-PTX was quite stable and, RP was found >99 % up to 6-h without any significant change ( $p>0.05$ ) (Table 1). At the same time, [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-nab-PTX was incubated with 37 MBq of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc during 6-h for radiolabeling. The loaded amount of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc in nab-PTX was also presented in Table 1. Our results showed that over 99% of added [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc were loaded into the nab-PTX.

**Table 1.** The radiochemical purity of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-nab-PTX and loaded amount of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc up to 6-h.

Time (h)	[ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-nab-PTX (%)	Loaded amount of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc (MBq)
0.25	99.28 ± 0.11	36.73 ± 0.03
1	99.46 ± 0.26	36.80 ± 0.02
2	99.36 ± 0.15	36.76 ± 0.03
3	99.18 ± 0.06	36.70 ± 0.03
4	99.34 ± 0.16	36.76 ± 0.02
5	99.27 ± 0.21	36.73 ± 0.04
6	99.45 ± 0.19	36.80 ± 0.01

In cell culture studies, [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-nab-PTX was treated with cell media for 2-h. So, the stability of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-nab-PTX in cell media was assessed, and the results were presented in Figure 2.



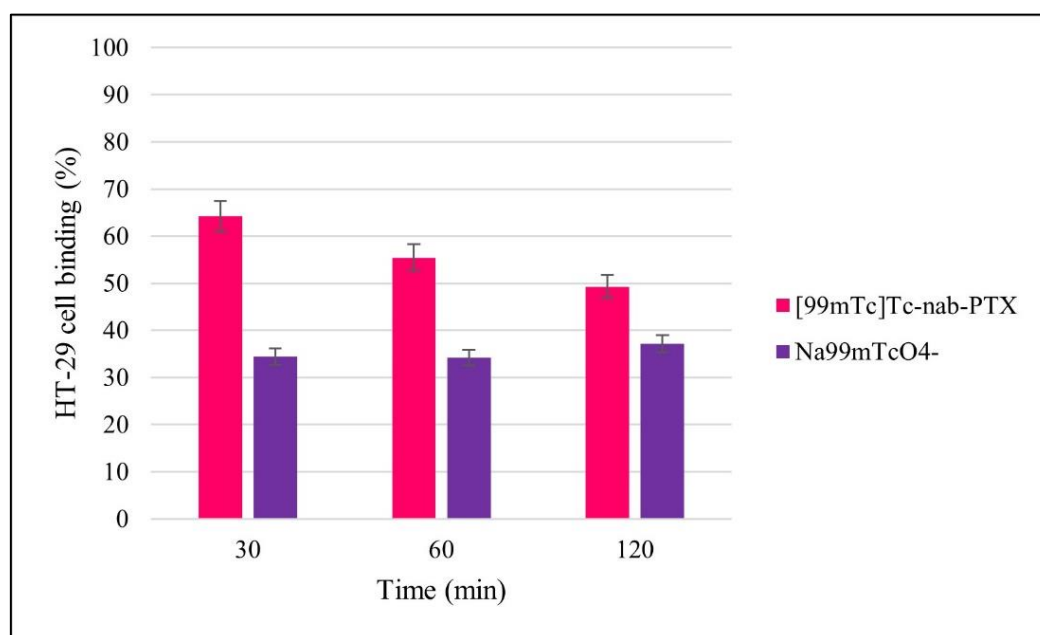
**Figure 2.** The radiochemical purity of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-nab-PTX in cell medium up to 2-h.

\*Cell medium: McCoy's 5A containing 10% fetal bovine serum

The RP of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-nab-PTX in cell medium was found to be quite stable with >95% labeling efficiency ( $p < 0.05$ ) (Figure 2). So, [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-nab-PTX was found suitable for cell binding study.

Cell culture studies have an important place in recent research, since it is a very costly process to develop a cancer model in experimental animals due to the cost, technical infrastructure, and the need for specialized personnel. For this purpose, evaluating the efficacy of radionuclide-labeled drug formulations by cell culture studies is a very innovative research area [34-36]. In this study, the capacity of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-nab-PTX to bind to HT-29 cells was investigated. The tests were evaluated for 2-h due to the available half-life of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc. The cell binding percentage to HT-29 cell lines of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-nab-

PTX and R/H- $^{99m}\text{Tc}$ ]NaTcO<sub>4</sub> (as a control group) were shown in Figure 3.



**Figure 3.** Cell incorporation of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-nab-PTX on HT-29 cell line.

In addition to avoiding radiation damage to non-target tissue, the high binding ratio of radiolabeled formulations in the target tissue enables us to collect high-quality images. Low target/non-target ratio can localize in nontargeting organs and harm these tissues, while also affecting the quality of target organ images [37]. As seen in Figure 3, [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-nab-PTX had a greater cell binding activity on HT-29 cells than R/H- $^{99m}\text{Tc}$ ]NaTcO<sub>4</sub> during experimental time *via* passive targeting. The cell binding percentage of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-nab-PTX was ranged from 64.24±3.51% at 30-min to 49.29±2.53% at 120-min. [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-nab-PTX had a rate of almost 2 times higher to cancer cells than R/H- $^{99m}\text{Tc}$ ]NaTcO<sub>4</sub> [9,38].

Also, to control the study, the cell binding percentage of R/H- $^{99m}\text{Tc}$ ]NaTcO<sub>4</sub> was ranged from 34.43±1.56% at 30-min to 37.14±1.78% at 120-min. This finding demonstrates that our radiolabeled formulation reacted differently in cell medium than R/H- $^{99m}\text{Tc}$ ]NaTcO<sub>4</sub> and verified the high labeling efficiency and *in vitro* stability.

In conclusion, nab-PTX was successfully radiolabeled with high radiochemical purity (>99%). The [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-nab-PTX was found to be stable in saline up to 6-h, and in cell media up to 2-h. According to the *in vitro* cell culture studies, [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-nab-PTX had a greater cell binding activity on HT-29 cells than R/H- $^{99m}\text{Tc}$ ]NaTcO<sub>4</sub> at 30 min. In the light of the data obtained, it was found that this nanoparticulate radiopharmaceutical prepared for colorectal cancer imaging is a step for *in vivo* studies. Further studies with [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-nab-PTX are in progress in order to evaluate biodistribution and imaging of the complex in experimental animals.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank to Ege University Nuclear Medicine Department for obtaining [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc and to Prof. Dr. Emel Öykü Çetin Uyanıkgil for providing cell line.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: M.E., D.İ.Ö.; Design: M.E., D.İ.Ö.; Control: M.E., D.İ.Ö.; Sources: M.E., D.İ.Ö.; Materials: M.E., D.İ.Ö.; Data Collection and/or Processing: M.E.; Analysis and/or Interpretation: M.E.; Literature Review: M.E.; Manuscript Writing: M.E.; Critical Review: M.E., D.İ.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. Siegel, R.L., Miller, K.D., Fuchs, H.E., Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1), 7-33. [\[CrossRef\]](#)
2. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. [\[CrossRef\]](#)
3. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D.M., Piñeros, M., Znaor, A., Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4), 778-789. [\[CrossRef\]](#)
4. Croce, C.M. (2008). Oncogenes and cancer. *New England Journal of Medicine*, 358, 502-511. [\[CrossRef\]](#)
5. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. (2019). Türkiye Kanser İstatistikleri 2016. From [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye\\_Kanser\\_statistikleri\\_2016.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_statistikleri_2016.pdf). Accessed date: 01.08.2022.
6. Smith, N., Webb, A. (2010). Nuclear Medicine: Planar Scintigraphy, SPECT and PET/CT. In: N. Smith and A. Webb (Eds.), *Introduction to Medical Imaging: Physics, Engineering and Clinical Applications*, (pp. 89-144). Cambridge: Cambridge University Press. [\[CrossRef\]](#)
7. Elgazzar, A.H. (2015). *The Pathophysiologic Basis of Nuclear Medicine*. Springer International Publishing, Switzerland, p.753. [\[CrossRef\]](#)
8. Diniz, S.O.F., Siqueira, C.F., Nelson, D.L., Martin-Comin, J., Cardoso, V.N. (2005). Technetium-99m ceftizoxime kit preparation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(spe2), 89-96. [\[CrossRef\]](#)
9. Banerjee, I., Behera, A., De, K., Chattopadhyay, S., Sachdev, S.S., Sarkar, B., Ganguly, S., Misra, M. (2015). Synthesis, characterization, biodistribution and scintigraphy of <sup>99m</sup>Tc-paclitaxel: a potential tracer of paclitaxel. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 304, 633-643. [\[CrossRef\]](#)
10. Kim, E.E. (2013). Radiopharmaceuticals in nuclear pharmacy and nuclear medicine. *Journal of Nuclear Medicine*, 54(2), 324-325. [\[CrossRef\]](#)
11. Montminy, E.M., Jang, A., Conner, M., Karlitz, J.J. (2020). Screening for colorectal cancer. *Medical Clinics of North America*, 104(6), 1023-1036. [\[CrossRef\]](#)
12. Stockenhuber, K., East, J.E. (2019). Colorectal cancer: prevention and early diagnosis. *Medicine (United Kingdom)*, 47(7), 395-399. [\[CrossRef\]](#)
13. Palestro, C.J., Love, C., Tomas, M.B. (2007). Infection and Inflammation. In: S. Treves (Ed.), *Pediatric Nuclear Medicine/PET*, (pp. 419-445). Springer, New York, NY. [\[CrossRef\]](#)
14. Ekinci, M., İlem-Özdemir, D. (2021). Radyofarmasötikler ve teranostikler. *Journal of Literature Pharmacy Sciences*, 10(1), 119-132. [\[CrossRef\]](#)
15. Zolle, U. (2007). *Technetium-99m Pharmaceuticals: Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine*. Springer Berlin, Heidelberg, p. 345. [\[CrossRef\]](#)
16. Rathmann, S.M., Ahmad, Z., Slikboer, S., Bilton, H.A., Snider, D.P., Valliant, J.F. (2019). The Radiopharmaceutical Chemistry of Technetium-99m. In: J. Lewis, A. Windhorst, B. Zeglis (Eds.), *Radiopharmaceutical Chemistry*, (pp. 311-333). Springer, Cham. [\[CrossRef\]](#)
17. Brigger, I., Dubernet, C., Couvreur, P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(5), 631-651. [\[CrossRef\]](#)
18. Gradishar, W.J., Krasnojon, D., Cheporov, S., Makhson, A.N., Manikhas, G.M., Clawson, A., Bhar, P., McGuire, J.R., Iglesias, J. (2012). Phase II trial of nab-paclitaxel compared with docetaxel as first-line chemotherapy in patients with metastatic breast cancer: Final analysis of overall survival. *Clinical Breast Cancer*, 12(5), 313-321. [\[CrossRef\]](#)
19. Gradishar, W.J., Krasnojon, D., Cheporov, S., Makhson, A.N., Manikhas, G.M., Clawson, A., Bhar, P. (2009). Significantly longer progression-free survival with nab-paclitaxel compared with docetaxel as first-line therapy for metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(22), 3611-3619. [\[CrossRef\]](#)
20. O'Shaughnessy, J., Gradishar, W.J., Bhar, P., Iglesias, J. (2013). Nab-Paclitaxel for first-line treatment of patients with metastatic breast cancer and poor prognostic factors: A retrospective analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 138(3), 829-837. [\[CrossRef\]](#)

21. Fu, Q., Sun, J., Zhang, W., Sui, X., Yan, Z., He, Z. (2009). Nanoparticle albumin-bound (NAB) technology is a promising method for anti-cancer drug delivery. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 4(3), 262-272. [\[CrossRef\]](#)
22. NCT03693677. (2018). First Line Metastatic Pancreatic Cancer: 5FU/LV+Nal-IRI, Gemcitabine+Nab-paclitaxel or a Sequential Regimen of 2 Months 5FU/LV+Nal-IRI.
23. Von Hoff, D.D., Ramanathan, R.K., Borad, M.J., Laheru, D.A., Smith, L.S., Wood, T.E., Korn, R.L., Desai, N., Trieu, V., Iglesias, J.L., Zhang, H., Soon-Shiong, P., Shi, T., Rajeshkumar, N.V., Maitra, A., Hidalgo, M. (2011). Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: A phase I/II trial. *Journal of Clinical Oncology*, 29(34), 4548-4554. [\[CrossRef\]](#)
24. Desai, N., Trieu, V., Yao, Z., Louie, L., Ci, S., Yang, A., Tao, C., De, T., Beals, B., Dykes, D., Noker, P., Yao, R., Labao, E., Hawkins, M., Soon-Shiong, P. (2006). Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clinical Cancer Research*, 12(4), 1317-1324. [\[CrossRef\]](#)
25. Stinchcombe, T.E. (2007). Nanoparticle albumin-bound paclitaxel: A novel Cremphor-EL®-free formulation of paclitaxel. *Nanomedicine*, 2(4), 415-423. [\[CrossRef\]](#)
26. Ten Tije, A.J., Verweij, J., Loos, W.J., Sparreboom, A. (2003). Pharmacological effects of formulation vehicles: Implications for cancer chemotherapy. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(7), 665-685. [\[CrossRef\]](#)
27. Van Tellingen, O., Huizing, M.T., Nannan Panday, V.R., Schellens, J.H.M., Nooijen, W.J., Beijnen, J.H. (1999). Cremophor EL causes (pseudo-) non-linear pharmacokinetics of paclitaxel in patients. *British Journal of Cancer*, 81(2), 330-335. [\[CrossRef\]](#)
28. Sparreboom, A., Van Zuylen, L., Brouwer, E., Loos, W.J., De Bruijn, P., Gelderblom, H., Pillay, M., Nooter, K., Stoter, G., Verweij, J. (1999). Cremophor EL-mediated alteration of paclitaxel distribution in human blood: Clinical pharmacokinetic implications. *Cancer Research*, 59(7), 1454-1457.
29. Desai, N., Trieu, V., Damascelli, B., Soon-Shiong, P. (2009). SPARC expression correlates with tumor response to albumin-bound paclitaxel in head and neck cancer patients. *Translational Oncology*, 2(2), 59-64. [\[CrossRef\]](#)
30. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K. (2000). Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *Journal of Controlled Release*, 65(1-2), 271-284. [\[CrossRef\]](#)
31. Çintaş, D. (2022). Master Thesis. Evaluation of the potential use of radiolabeled nab-paclitaxel in the diagnosis of breast cancer. Department of Radiopharmacy, Institute of Health Sciences, Ege University, Izmir, Türkiye.
32. Costa, B., İlem-Özdemir, D., Santos-Oliveira, R. (2019). Technetium-99m metastable radiochemistry for pharmaceutical applications: Old chemistry for new products. *Journal of Coordination Chemistry*, 72(11), 1759-1784. [\[CrossRef\]](#)
33. Pijera, M., Viltres, H., Kozempel, J., Sakmár, M., Vlk, M., İlem-Özdemir, D., Ekinci, M., Srinivasan, S., Rajabzadeh, A.R., Ricci-Junior, E., Alencar, L., Al Qahtani, M., Santos-Oliveira, R. (2022). Radiolabeled nanomaterials for biomedical applications: radiopharmacy in the era of nanotechnology. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, 7(1), 8. [\[CrossRef\]](#)
34. Ekinci, M., Santos-Oliveira, R., İlem-Özdemir, D. (2022). Biodistribution of <sup>99m</sup>Tc-PLA/PVA/Atezolizumab nanoparticles for non-small cell lung cancer diagnosis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 176, 21-31. [\[CrossRef\]](#)
35. Ekinci, M., Öztürk, A.A., Santos-Oliveira, R., İlem-Özdemir, D. (2022). The use of Lamivudine-loaded PLGA nanoparticles in the diagnosis of lung cancer: Preparation, characterization, radiolabeling with <sup>99m</sup>Tc and cell binding. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 69, 103139. [\[CrossRef\]](#)
36. Ekinci, M., İlem-Özdemir, D., Gundogdu, E., Asikoglu, M. (2015). Methotrexate loaded chitosan nanoparticles: Preparation, radiolabeling and *in vitro* evaluation for breast cancer diagnosis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 30(A), 107-113. [\[CrossRef\]](#)
37. Maruvada, P., Wang, W., Wagner, P.D., Srivastava, S. (2005). Biomarkers in molecular medicine: Cancer detection and diagnosis. *BioTechniques*, Suppl, 9-15. [\[CrossRef\]](#)
38. Monteiro, L.O.F., Fernandes, R.S., Oda, C.M.R., Lopes, S.C., Townsend, D.M., Cardoso, V.N., Oliveira, M.C., Leite, E.A., Rubello, D., de Barros, A.L.B. (2018). Paclitaxel-loaded folate-coated long circulating and pH-sensitive liposomes as a potential drug delivery system: A biodistribution study. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 97, 489-495. [\[CrossRef\]](#)





## FORMULATION AND EVALUATION OF PARENTERAL *IN-SITU* FORMING BIODEGRADABLE IMPLANT FOR CONTROLLED RELEASE OF LEVOTHYROXINE SODIUM

*LEVOTİROKSİN SODYUMUN KONTROLLÜ SALIMI İÇİN IN-SITU PARENTERAL BİYOBOZUNUR İMPLANT FORMÜLASYONU VE DEĞERLENDİRİLMESİ*

Manish GOYANI<sup>1</sup> , Meghraj SURYAWANSHI<sup>1,2,3\*</sup> , Ridhdhesh JIVAWALA<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Shree Dhanvantary Pharmacy College, Department of Pharmaceutics, Kim, 394110, Surat, Gujarat, India

<sup>2</sup>Indukaka Ipcowala College of Pharmacy, A Constituent College of Charutar Vidya Mandal University, Department of Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology, New Vallabh Vidyanagar, GIDC, 388121, Anand, Gujarat, India

<sup>3</sup>Jaipur National University, School of Pharmaceutical Sciences, 302017, Jaipur, Rajasthan, India

### ABSTRACT

**Objective:** *The objective of present research work is formulation and evaluation of parenteral in-situ forming biodegradable implant for controlled release of levothyroxine sodium.*

**Material and Method:** *The present study used N-Methyl pyrrolidone (NMP) and triacetin as solvents and PLGA as a biodegradable polymer to manufacture two biodegradable polymeric drug delivery systems, in-situ forming implant (ISFI) and in-situ micro particles (ISM). Other evaluation tests, such as sterility, percent drug entrapment capacity, and so on, were also carried out. ISFI and ISM were tested for up to one month at three different temperatures (4°C, 25°C, and 40°C).*

**Result and Discussions:** *The drug release from both systems was compared. In batch F4, burst release was 10.72%, while in batch EP8, it was 8.16%. F4 was released 94.54% in roughly 30 days and EP8 was released 95.72%. The polymer content, type of solvent (hydrophilic or hydrophobic), and implant morphology all contributed to increased burst release in the ISFI formulation. Burst release was decreased using a combination of hydrophilic and hydrophobic solvents (NMP and Triacetin). When compared to other formulations, ISM had the lowest burst release. Both the ISFI and ISM formulations might deliver medications for up to 30 days. Both formulation show good*

\* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Meghraj Suryawanshi  
e-mail / e-posta: suryawanshimeghraj917@gmail.com, Phone / Tel.: +918668430089

drug entrapment efficiency F4 (87.74%) and EP8 (90.37%) respectively. Both formulations passed all their physicochemical properties included visual examination, pH, and injectability respectively. No visible growth of microorganisms was seen in growth media treated with both formulations after 30 days. The injection site (on the skin) and adjacent muscles showed no symptoms of irritation. It was confirmed when the results were compared to those of the control group. There was no hyperemia, discoloration, or necrosis at the site and no sign of irritation by both formulations. In the case of ISM (EP8), drug release follows zero order kinetics with an  $R^2$  value of 0.9814 and ISFI (F4) follows Korsmeyer peppas and both transport drug through Fickian diffusion mechanism. Both formulations were found to, be stable. Hence, Long-acting Levothyroxine sodium formulations (ISFI & ISM) may be a superior option for hypothyroidism treatment.

**Keywords:** Biodegradable polymers, ISFI, ISM, in-situ implant, solvent exchange technique.

## ÖZ

**Amaç:** Mevcut araştırmanın amacı, kontrollü levotiroksin sodyum salımı için parenteral in-situ oluşan biyobozunur implantın formülasyonu ve değerlendirilmesidir.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada, in-situ implant (ISFI) ve in-situ mikro parçacıkları (ISM) şeklindeki iki biyobozunur polimerik ilaç taşıyıcı sistemi hazırlamak için çözücü olarak N-Metil piroolidon (NMP) ile triasetin ve biyobozunur polimer olarak da PLGA kullanılmıştır. Sterilite, etken madde yükleme kapasitesi yüzdesi ve benzeri diğer değerlendirme testleri de gerçekleştirilmiştir. ISFI ve ISM, bir aya kadar üç farklı sıcaklık (4°C, 25°C ve 40°C) değerinde test edilmiştir.

**Sonuç ve Tartışma:** Her iki sistemden etken madde salımı karşılaştırıldı. F4 kodlu formülasyonda başlangıç doz boşalması %10.72 iken, EP8 kodlu da %8.16'di. Etken madde F4 kodlu formülasyondan yaklaşık 30 günde %94.54 ve EP8 kodlu formülasyondan %95.72 düzeyinde açığa çıkmıştır. Polimer içeriği, çözücü tipi (hidrofilik veya hidrofobik) ve implant morfolojisi olmak üzere hepsi, ISFI formülasyonundan başlangıç doz boşalmasının artmasına katkıda bulunmuştur. Başlangıç doz boşalması, hidrofilik ve hidrofobik çözücülerin (NMP ve Triasetin) kombinasyonu kullanıldığında azaltılmıştır. Diğer formülasyonlarla karşılaştırıldığında, ISM en başlangıç doz boşalmasına sahiptir. Hem ISFI hem de ISM formülasyonları, etken maddeleri 30 güne kadar verebilmektedir. Her iki formülasyon da sırasıyla iyi etken madde yükleme etkinliği F4 (%87.74) ve EP8 (%90.37) göstermektedir. Her iki formülasyon da sırasıyla görsel inceleme, pH ve enjekte edilebilirlik dahil tüm fizikokimyasal özelliklerinden geçmiştir. 30 gün sonra her iki formülasyonla işleme tabi tutulan büyüme ortamındaki mikroorganizmaların gözle görülür bir büyümesi görülmedi. Enjeksiyon bölgesi (cilt üzerinde) ve bitişik kaslar hiçbir irritasyon belirtisi göstermedi. Sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doğrulanmıştır. Her iki formülasyonda da irritasyon belirtisi ve enjeksiyon bölgesinde hiperemi, renk değişikliği veya nekroz yoktu. Her iki formülasyonun da stabil olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, uzun etkili Levotiroksin sodyum formülasyonları (ISFI ve ISM), hipotiroidizm tedavisi için üstün bir seçenek olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyobozunur polimerler, ISFI, ISM, in situ implant, solvent değişim tekniği.

## INTRODUCTION

Hypothyroidism is a disease in which the thyroid gland fails to produce enough thyroid hormone to meet the body's metabolic needs [1-3]. Dyslipidemia, infertility, cognitive impairment, hypertension, neuromuscular dysfunction, and other symptoms of untreated hypothyroidism might occur. There is no cure for it, and the patient must supplement with Thyroxin from tablets (Levothyroxine Sodium Tablets) to maintain normal TSH levels [4]. Levothyroxine (T4) and Liothyronine (T3) are the most often used supplements in treatment. Levothyroxine is the more often utilized of the two. Levothyroxine Sodium is a synthetic version of the main thyroid hormone that is used to treat hypothyroidism, as well as Myxedema coma and other thyroid problems [5].

The main disadvantage of this treatment (oral) is that patients must take tablets every day, and the overall effectiveness of treatment reduces as a result of patient noncompliance, such as drug-food interactions, irregular administration, or missing doses [6-8]. Parenteral thyroxin is required in some circumstances, such as severe malabsorption of thyroxin via the oral route, and typical parenteral treatment involves frequent dosage, which is uncomfortable [8-10]. As a result, a long-acting formulation of Levothyroxine sodium is needed, one that can release the hormone in a controlled manner



over a longer period of time. This will eventually improve patient compliance and aid in achieving a more consistent hormone plasma concentration in the body [10].

This type of new drug delivery method is well suited for PLGA-based long-acting in situ biodegradable implant formulation [11,12]. Biodegradable injectable implant drug delivery devices represent a novel physical method to improving drug pharmacokinetics and pharmacodynamics. Other benefits include medication distribution at a controlled rate into the systemic circulation for a longer period of time, less frequent administration maintaining a better therapeutic level of drug, elimination of patient-related errors (Medication non-adherence), and lower total treatment costs. As a result, the focus of the research is on the development and characterization of such formulations [13,14].

In the market, only oral pills and traditional parenteral solutions are available. There is no controlled-release formulation available. For the need of long-term controlled release of Levothyroxine Sodium, In-Situ Implant (ISFI) or In-Situ Micro particles (ISM) may be the ideal drug delivery technology. The goal of this research is to develop a stable ISFI or ISM-based drug delivery system for the long-term controlled release of Levothyroxine Sodium for hypothyroidism treatment.

## **MATERIAL AND METHOD**

### **Materials**

Levothyroxine Sodium Purchased from Taj Mahal VisionChemicals Pvt. Ltd. Mumbai, India. PLGA has obtained a Gift sample from Evonik, Mumbai. N-Methyl 2-Pyrrolidone and Triacetin were obtained Gift Sample from Research Lab FineChemicals, Ankleshwar. Tween 80, Span 80, Sodium Azide, Potassium DihydrogenPhosphate, Potassium Chloride, Sodium Chloride, and Disodium HydrogenPhosphate was purchased from Merck Private Ltd, Mumbai. All other materials were used of analytical grade.

### **Methods**

#### **Determination of Absorption Maxima ( $\lambda$ max) of Levothyroxine Sodium**

A 1 ml standard stock solution of Levothyroxine Sodium (100 $\mu$ g/ml) was transferred to a 10 ml volumetric flask and the volume was adjusted to 10 ml with phosphate buffer pH 7.4 before the absorbance of the solution was scanned in the range of 200 to 400 nm using a double beam UV-visible Spectrophotometer. The absorbance maxima were determined by scanning a 10 $\mu$ g/ml solution [15-17].

#### **Methodology for Preparation of ISFI & ISM**

Figure 1&2 explained in detail the preparation of ISFI and ISM [19].

#### **Evaluation of ISFI and ISM**

#### **Physicochemical Properties of ISFI and ISM**

Visual examination, pH of the formulation was all performed according to the protocol [20].

#### **Syringeability & Injectability**

Syringe ability (ease of withdrawal from vial to syringe) and Inject ability (formulation performance during injection) are two very important parameters in handling & delivering formulation safely to patient. Syringeability of formulation was evaluated by transferring formulation into the vial using different gauge of needle & Injectability was evaluated by Injecting from the different gauges of needles. The ease of injection was observed [20].

#### **Drug Entrapment Efficiency**

To find entrapment of drug during solidification process (Implant formation) 0.5 ml of formulation (polymeric solution (ISFI)) was injected into 50 ml of phosphate buffer & the formation of Implant was occurred. After formation of it (after 1 minute) 2 ml of phosphate buffer was taken & evaluated for drug content using HPLC. The released drug after 1 minute was subtracted from the total

drug loaded. That will directly give the amount of drug entrapped inside formed Implant [20]. The entrapment efficiency calculated using following formula:

$$\text{Drug entrapment efficiency} = \frac{\text{Total Drug loaded} - \text{Drug released just after implant formation}}{\text{Total drug loaded}} * 100 \text{ ----- (1)}$$

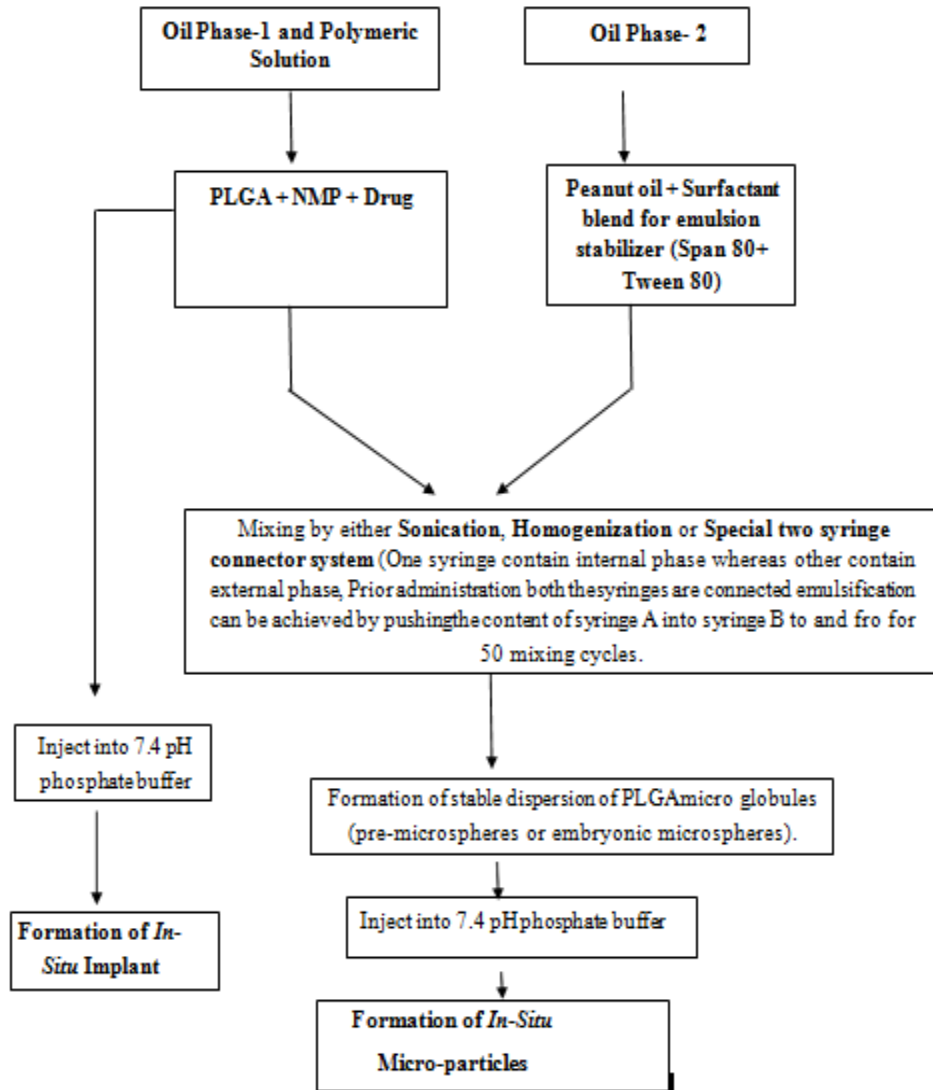


Figure 1. Method of preparation of ISFI & ISM

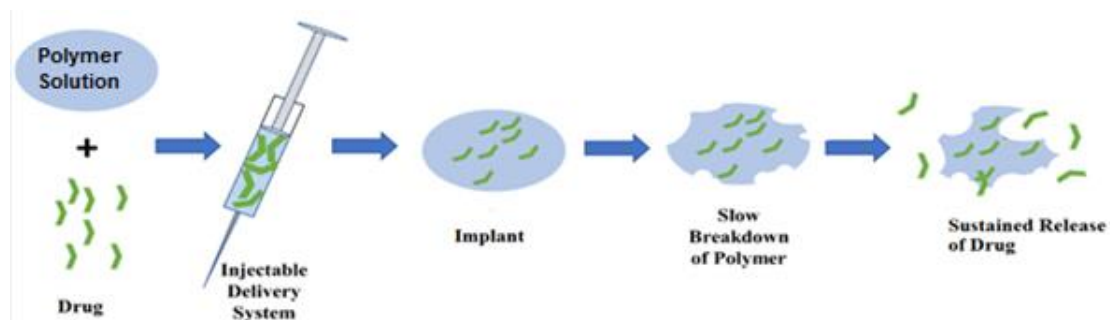


Figure 2. Graphical presentation of preparation of implant

### **Morphology Study of ISFI & ISM**

The 0.5 ml formulation was injected into phosphate-buffered saline pH 7.4 at 37°C, and the morphology of the implant formed was evaluated until the polymer matrix was entirely dissolved by hydrolytic cleavage. After injection, the in-situ micro particles were filtered and dried for ISM formulation. The sample was subsequently taken to the facility for SEM analysis [20,21].

### ***Ex-vivo* Formation of ISFI & ISM**

Monitoring the growth of muscle implants 0.5 ml of the formulation was injected into the chicken leg muscle using 21 gauge needles. To make it easier to visualize how the implants formed, patent blue dye was added to the mixture. After 15 minutes, dissecting the chicken leg muscle revealed the formation of an Implant (at the injection site). After injecting 0.9 ml formulation using a 21 gauge syringe, a small tissue section was taken from the injection site and the development of In-situ micro particles was studied under an optical microscope [22,23].

### **Sterility Testing**

Sterility testing is essential since ISFI and ISM are parenteral formulations. The samples were evaluated for sterility using the "Direct Inoculation Method" under aseptic circumstances. Both ISFI and ISM were made in an aseptic atmosphere and then filtered with a 0.22 micron syringe filter. The formula was kept in sterile containers. Finally, for microbial growth testing, sterile SCDM (Soybean Casein Digestive Media) was utilized to inoculate both ISFI and ISM. Inoculation procedures were placed in a LAF chamber. Microbial growth was assessed using visual examinations [24,25].

### ***In-vitro* Drug Release**

#### **For ISFI**

ISFI was tested *in-vitro* by injecting 0.5 ml of the formulation into 50 ml of PBS pH 7.4 in an incubator shaker bath. The temperature was kept constant at 37°C. Sampling was done after 1 hour, 3 hours, 6 hours, 12 hours, 1 day, 3 days, 7 days, 12 days, 19 days, 25 days, and 30 days. The sample analysis was carried out using HPLC [26].

#### **For ISM**

The *in-vitro* drug release experiment from ISM was investigated using dialysis. The LA 390-5 MT dialysis membrane was cut into 1.2-inch lengths and submerged overnight in phosphate buffer saline pH 7.4. 1 ml of EP8 formulation was injected onto a dialysis membrane (tube) that had been pre-loaded with 2 ml of phosphate buffer saline (PBS). The membrane's ends were stitched together to prevent leakage. In a beaker containing 50 ml of release media, the entire system (dialysis tube filled with generated micro-particles) was incubated at 37°C with light agitation (PBS). Sampling was done after 1 hour, 3 hours, 6 hours, 12 hours, 1 day, 3 days, 7 days, 12 days, 19 days, 24 days, and 30 days. HPLC was used to analyze the samples [23].

### **Post Injection Tissue Irritation Test**

Because the formulation was designed for intramuscular administration, skin irritancy should be evaluated. Skin irritation experiments on Albino Wister male rats (age, 10 to 16 wk; weight, 17 to 30 g; 6 male (3 control and 3 treated) were used to measure irritancy after a single application of ISFI and ISM. The test solutions (ISFI & ISM) were injected intramuscularly into the rat's M. vastus medialis as follows: the rat was securely placed in a supine position without anesthesia. One of the back legs was linked and stacked on top of the other. This method made it easy to inject the test solutions into the muscle's core. The fur from the injection site was removed with an electric trimmer. With a 1-ml syringe, a 21-gauge needle was inserted into the skin of the thigh at an angle of around 30 degrees to the center of the muscle. The test solution was then injected gently into a 0.5 ml volume [24-26]. The ethical committee approval number SDPC/AFC12017/12.

## Kinetic Study and Mechanism of Drug Release

To determine the drug's release mechanism, data from the ISFI and ISM release studies were statistically analyzed using the Zero order, First order, Higuchi, and Korsmeyer Peppas equations.

## Stability Study

To assess formulation stability, final formulations were subjected to an ICH guideline Q1C stability analysis. The ISFI (F4) and ISM (EP8) formulations were stored at  $40\pm 2^\circ\text{C}$  &  $75\%\pm 5\%\text{RH}$  relative humidity. The pH and medication content were measured for up to one month. The pH was obtained by placing the electrode directly into the formula using a pH meter. An aliquot of each sample was taken, mixed with a predetermined volume of methanol, centrifuged at 5000 RPM, filtered through a  $0.22\mu$  filter, and HPLC was used to evaluate the resulting solution. The ISM method only utilized the methanol component (at the top) for drug analysis, while the fraction separated at the bottom (oil part) was discarded. ISM formulations' pH and pharmacological concentration were also measured [24-27].

## RESULT AND DISCUSSION

### Absorption Maxima ( $\lambda_{\text{max}}$ ) of Metronidazole

Identification and Confirmation of the drug were carried out by UV. From the UV spectroscopic analysis in (Figure 3), the maximum wavelength is found at 225.00 nm & the standard reported value is also 225.00 nm. Hence, 225.00 nm is taken as a maximum wavelength.

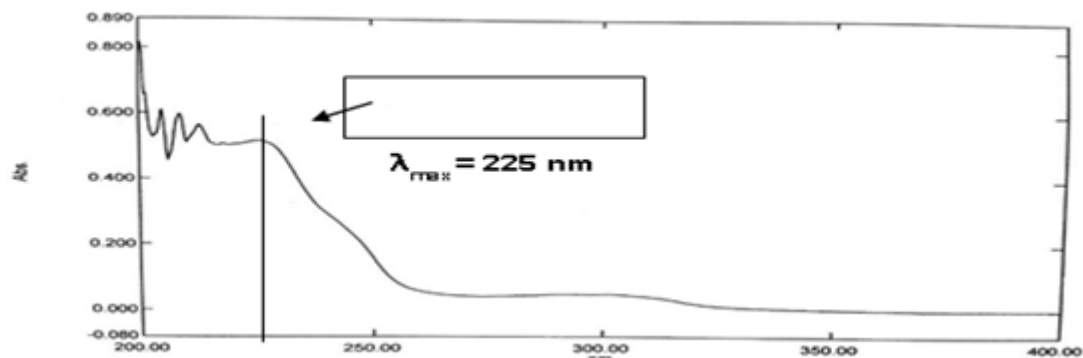


Figure 3.  $\lambda_{\text{max}}$  of levothyroxine sodium in phosphate buffer pH 7.4

### Preparation of ISFI & ISM

The formulation batches of ISFI and ISM was explained in (Table 1&2).

Table 1. Formulation of ISFI.

<i>In-situ</i> Implant formulation		
Formulation Code	PLGA 50:50 (% w/v)	Solvent
F1	20%	0.5 ml NMP
F2	30%	0.5 ml NMP
F3	40%	0.5 ml NMP
Optimization of Polymer concentration Optimization of Burst release using a solvent combination		
	Optimized polymer Concentration (%w/v)	NMP: TA
F4	30%	90:10
F5	30%	70:30
F6	30%	50:50
NMP: N -Methyl 2- Pyrrolidone TA: Triacetin		

**Table 2.** Formulation of ISM

Internal Phase		
1	Levothyroxine Sodium	3 mg
2	N-Methyl 2-Pyrrolidone	0.3 ml
	PLGA	30 % w/v (of Internal phase Volume)
External Phase		
1	Peanut Oil	0.6 ml
	Surfactant blend (Span80 & Tween80)	10% V/V(of total formulation volume)

**Evaluation of ISFI and ISM****Physicochemical Properties of ISFI and ISM****Table 3.** Visual appearance of polymeric solutions

Formulation Code	Visual Inspection	Inference
<b><i>In-Situ Forming Implant (ISFI)</i></b>		
F1	Clear, colorless, less viscous liquid	Due to low polymer concentration(20%) & freely solubility of the drug in NMP
F2	Clear, colorless, Slightly viscous liquid	Due to the higher polymer concentration (30%) &freely solubility of a drug in NMP
F3	Clear, colorless, highly viscous liquid	Due to higher polymer concentration (40%) & freely solubility of a drug in NMP
F4	Cloudy, colorless, highly viscous liquid	Cloudiness because of partial solubility of drug in Triacetin (NMP: TA50:50)
F5	Clear, colorless, slightly viscous liquid	Because of a higher amount of NMP than TA (70:30) aids drug to get solubilized.
F6	Clear, colorless, Slightly viscous liquid	Because of a higher amount of NMP than TA (90:10) aids drug to get solubilized.
<b><i>In-Situ Forming Microparticles (ISM)</i></b>		
EP8	Clear, yellowish, less viscous liquid	Complete Miscibility of both Internal & external phases

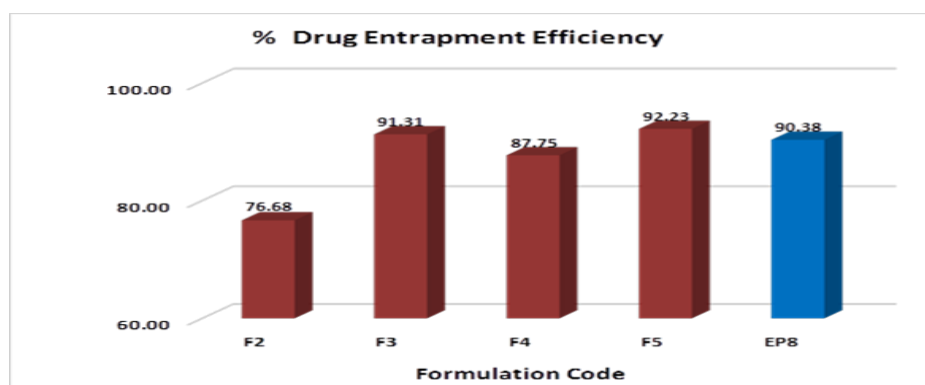
**Table 4.** Physicochemical properties of ISFI and ISM

Formulation Code	pH	24 Gauge syringe	22 Gauge syringe	21 Gauge syringe
<b><i>In-Situ Implant (ISFI)</i></b>				
F1	7.95 ± 0.054	Fail	Pass	Pass
F2	7.85 ± 0.036	Fail	Fail	Pass
F3	7.91 ± 0.147	Fail	Fail	Pass
F4	7.98 ± 0.164	Fail	Fail	Pass
F5	7.99 ± 0.156	Fail	Fail	Pass
F6	8.09 ± 0.110	Fail	Fail	Pass
<b><i>In-Situ Microparticles (ISM)</i></b>				
EP8	8.11 ± 0.077	Fail	Pass	Pass

The formulation's syringe-ability was tested by injecting it with different syringe gauges, as shown in (Table 3). All other formulation-related physicochemical characteristics are listed in (Table 4). It was remarked how simple it was to deliver shots. The higher gauge (24G, 23G, and 22G) syringes have insufficient Injectability due to the increasing viscosity of the polymeric solution (in the case of ISFI). As a result, a lower gauge (larger needles) is necessary to easily inject formulation. However, there was a higher amount of Injectability in the case of ISM [19].

### % Drug Entrapment Efficiency

The drug entrapment efficiency of different formulations is dependent on the type of solvent (hydrophilic or hydrophobic), the rate of solvent exchange, and the rate of implant formation, as shown in (Figure 4 and Table 5). In formulation F4, just NMP was used as a solvent, and because it is particularly hydrophilic, it is swiftly exchanged with the physiological fluid. The drug that has been solubilized in NMP but has not yet solidified into an implant is lost during this phase due to fluid exchange at the injection site. The implant solidifies soon after insertion due to the high polymer concentration in formulation F3. As a result, it has a high trapping efficiency. The formulations F4 and F5 are made up of a mix of hydrophilic and hydrophobic solvents (NMP and Triacetin), which results in a slower rate of solvent exchange. In the long run, it leads to better drug entrapment. The ISM formulation (EP8) also had high entrapment efficiency. The PLGA micro-globules in the emulsion harden and PLGA micro particles form as a result of the solvent exchange. Polymer concentration and syringe gauge were two more factors that influenced entrapment efficiency [22-24].



**Figure 4.** % Drug entrapment efficiency

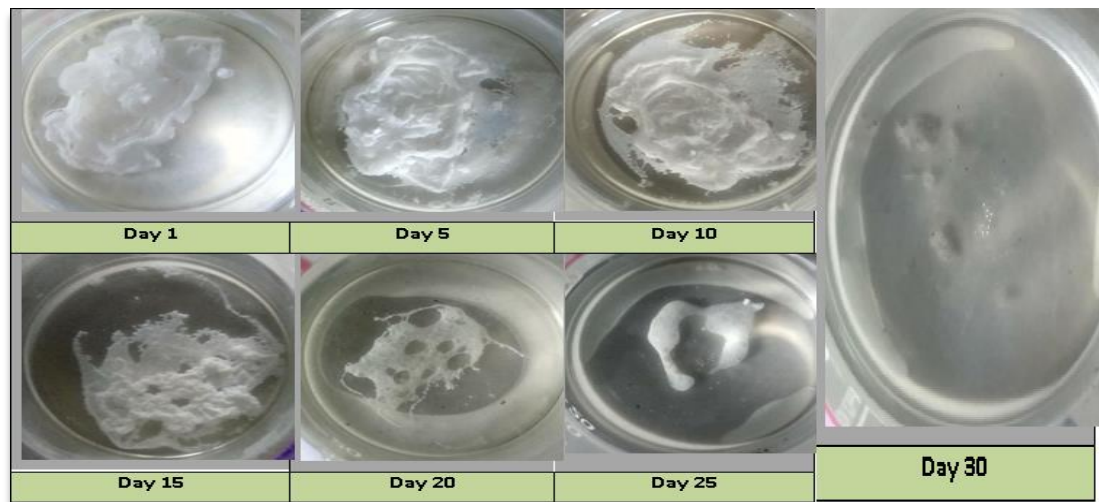
**Table 5.** % Drug Entrapment Efficiency

Formulation Code	% Drug Entrapment Efficiency
<b><i>In-Situ Forming Implant (ISFI)</i></b>	
F2	76.67±1.487
F3	91.30 ± 0.804
F4	87.74 ± 1.357
F5	92.23 ± 1.385
<b><i>In-Situ Micro-particles (ISM)</i></b>	
EP8	90.37 ± 1.174

### Morphology Study of ISFI & ISM

The morphology of the implant was investigated. Using a 0.5 ml formulation injected in phosphate-buffered saline pH 7.4 at 37°C, the morphology of produced Implants was examined up till complete breakdown of polymer matrix by hydrolytic cleavage. Due of bulk and surface erosion, the hydrolysable backbone of PLGA is prone to hydrolysis or enzymatic degradation in the cell environment. Water penetration and slow scissions of long polymer chains occur across the cross-

section in the former, whereas the latter is a surface occurrence in the later. The area exposed to the hydrolytic environment determines surface erosion, while the crystalline structure and porosity of the polymer matrix determine bulk erosion. (Figures 5,6,7, and 8) shows the ISFI morphological study and a SEM image of the ISM formulation, respectively [23]. Figure 8 i.e. SEM image of ISM (EP8) show crystalline structure and porosity of polymer matrix and show spherical shape of microparticles as shown in Figure 7.



**Figure 5.** Morphology study of ISFI (F4)



**Figure 6.** *In-vitro* formation of in situ microparticles (EP8)

### ***Ex-vivo* Formation of ISFI & ISM**

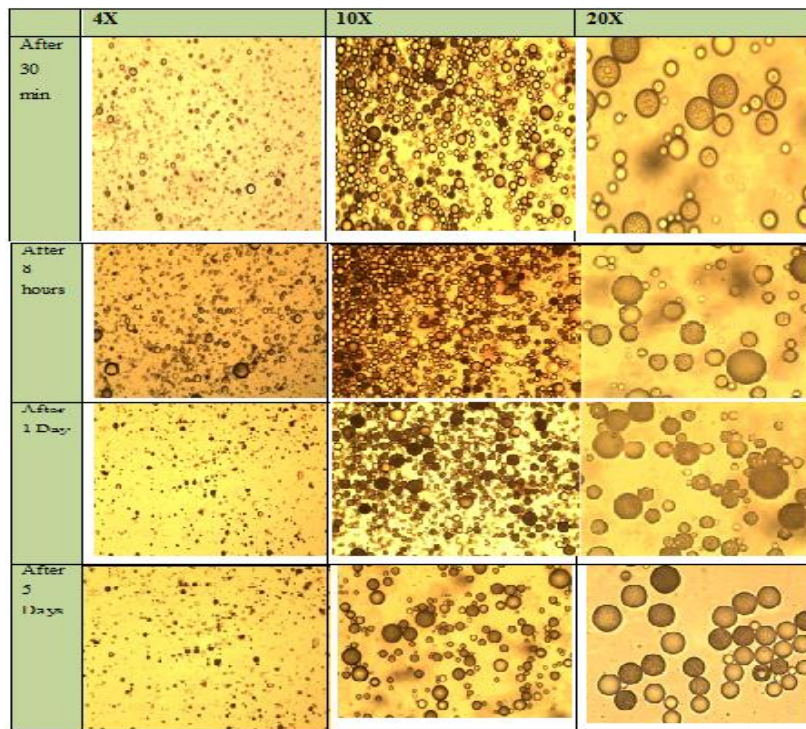
The chicken leg muscle was injected with 0.5 ml of the formulation via 21 gauge needles. To make it easier to visualize how the implants formed, patent blue dye was added to the mixture. After 30 minutes, dissecting the chicken leg muscle revealed the formation of an Implant (at the injection site). It formed a solid implant at the injection location, as seen in (Figure 9). The development of In situ hybridization was studied using a small tissue segment taken from the injection site. After injecting 0.5ml of formulation with a 21 gauge syringe, microparticles were inspected under an optical microscope. The formation of microparticles is depicted in (Figure 10) [25,26].

### **Sterility Testing**

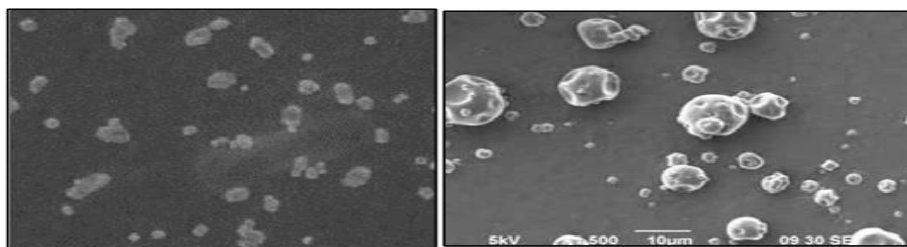
On sterility testing, both ISFI and ISM formulations showed microbe growth in SCDM growing media at regular intervals (filtered through 0.22-micron syringe filter). Throughout the 30-day



experiment, no visible growth of microorganisms was seen in growth media treated with formulations, as shown in (Figure 11).



**Figure 7.** Images of ISM formation under microscope (EP8)

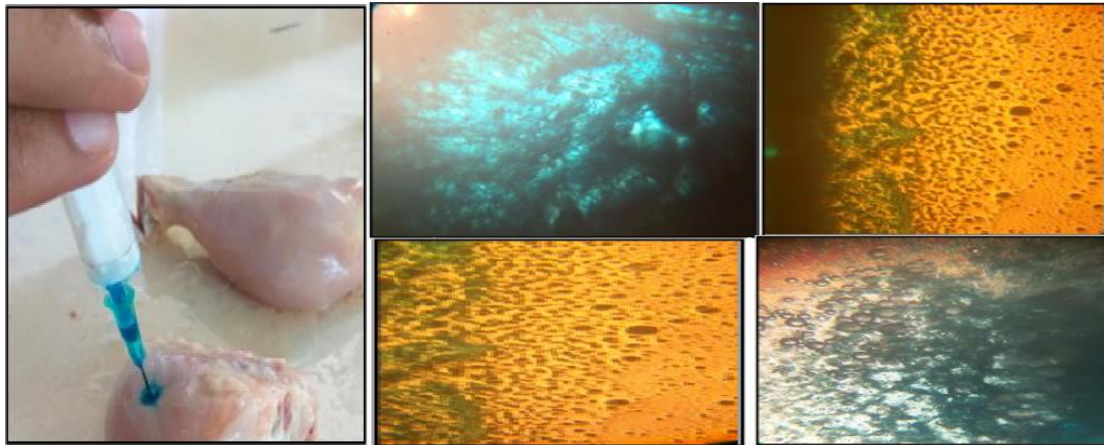


**Figure 8.** SEM images of ISM (EP8)

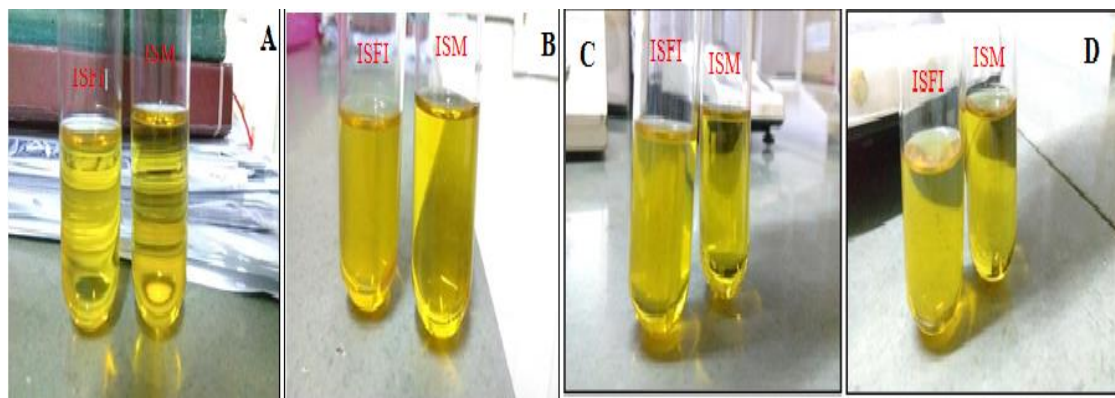


**Figure 9.** *Ex-Vivo* formation of ISFI





**Figure 10.** *Ex-Vivo* formation of ISM



**Figure 11.** Sterility testing of formulations (A) Day 1, (B) Day 10, (C) Day 20, (D) Day 30

### ***In-vitro* Drug Release Study of ISFI and ISM**

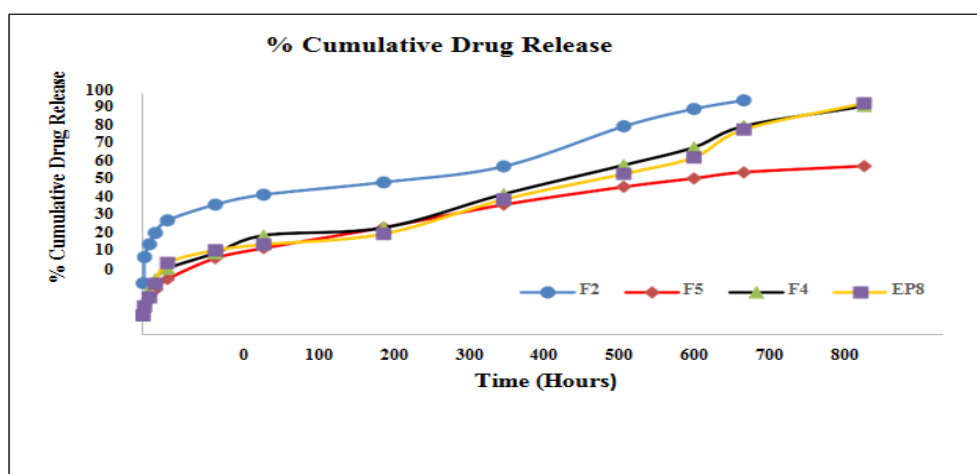
The gel or implant was generated promptly after injecting the formulation into the release medium stated in (Table 6). The entire *in-vitro* release of levothyroxine sodium from ISFI and ISM using PLGA is shown in (Figure 12). The primary disadvantage of ISFI systems is "initial burst release." This is the most prevalent occurrence when a hydrophilic solvent is used in the formulation. There are several options for dealing with this. One of these procedures was used on the formulation F2: "Combination of Hydrophobic Solvent with Hydrophilic Solvent." More batches F4, F5, and F6 were made using the solvent mixture (NMP & Triacetin in different ratios). It's also critical to choose a high-concentration hydrophobic solvent because it impacts the implant's breakdown period in addition to managing burst release. Higher doses slow decomposition, and it's not acceptable if it lasts more than 30 days. As a result, the last batch must be selected. *In-vitro* release testing was performed on batches F2, F4, and F5. (Batch F6 was rejected due to drug precipitation during storage.) In an *in-vitro* release investigation, Batch F2 exhibited the highest burst release (21%) and practically all medications were released within 25 days. In batch F4, burst release was 10.72 percent, while in batch F5, it was 9.44%. F4 was released in roughly 30 days, but F3 was released in about 60 days. Drug release in batch F5 remained incomplete (69.77%) after 30 days, showing that drug release in that formulation was extremely sluggish.

Out of the F2, F4, and F5 formulas, F4 was picked as the best batch. Another way for managing burst release is In-Situ micro particles (ISM), which scatter the polymeric phase in an external oil phase. It forms an emulsion with PLGA micro-globules that hardens when it comes into touch with physiological fluid. A vital stage in the procedure is locating RHLB of oil to stabilize ISM formulation (to prevent phase separation in the emulsion). There were 11 found here for peanut oil. This HLB created

the final ISM formulation, which was compared to the ISFI formulation in terms of *in-vitro* drug release. When compared to ISFI formulations F4 and F5, the ISM formulation EP8 showed less burst release (8.16%).

**Table 6.** *In-vitro* drug release study of ISFI and ISM

% Cumulative <i>in-vitro</i> drug release study of ISFI and ISM				
Time (Hours)	F2	F4	F5	EP8
1	21.33	10.72	9.44	8.16
3	32.22	14.17	12.80	11.78
6	37.49	18.85	14.67	15.50
12	42.17	23.01	18.63	21.14
24	47.30	27.45	23.04	29.74
72	53.87	33.84	31.73	34.97
120	57.93	41.11	35.82	37.35
240	63.07	44.29	44.38	41.74
360	69.61	58.19	53.80	55.97
480	86.19	70.16	61.16	66.55
550	93.38	77.5	64.68	73.38
600	98.91	86.29	67.22	84.89
720	-	94.54	69.77	95.72



**Figure 12.** *In-vitro* drug release study of ISFI and ISM

### Post Injection Tissue Irritation Test

The given study conducted with approval of institutional ethical committee approval number SDPC/AFC12017/12 and OECD, 1991 guidelines. To examine for tissue irritation at the injection site, a male albino Wister rat was given an intramuscular injection of formulation F4 (test). At the same time, the control group got saline via the i.m. route. After 48 hours, the rats were euthanized, and tissue irritation was measured using a dissection of the leg muscle as described in the literature. The injection site (on the skin) and adjacent muscles showed no symptoms of irritation [23-25]. It was confirmed when the results were compared to those of the control group. The irritation score of treated group was found to be 0.1 and when compared to control group [26]. As demonstrated in (Figure 13), the solid implant formed during dissection was also evident.



**Figure 13.** Local Tissue irritation test (A) Injection Site, (B) Group A: With normal Saline (post Injection) (c) Group B: ISFI formulation (post Injection), (D&E) Section of injection Site which shows no irritation.

### Drug Release Kinetics

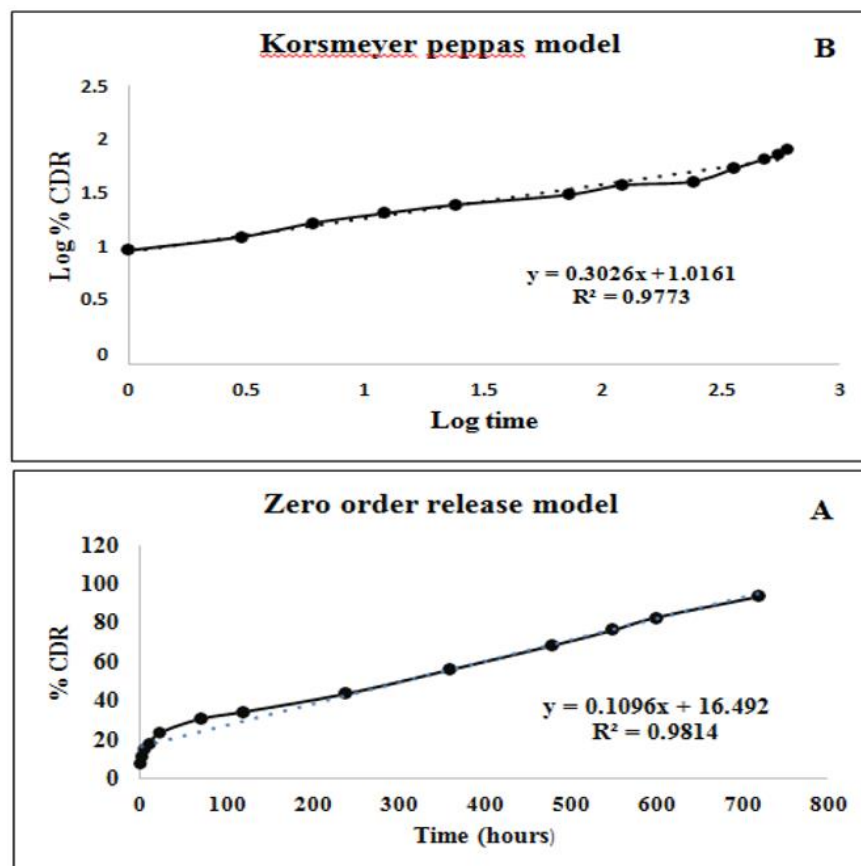
The method of releasing drugs from PLGA-based drug delivery systems is complicated. It occurs primarily through four drug release mechanisms: diffusion through a water-filled polymer, (ii) osmotic pumping, and (iv) polymer erosion (i.e. no drug transport). The release data was submitted to multiple kinetic models to determine the exact release mechanism of the medication from creating formulations. Various mathematical models have been utilized to describe drug release mechanisms from PLGA-based DDSs, including zero order, Higuchi and Korsmeyer, and Peppas models. According to the results, the regression coefficient value ( $R^2=0.9773$ ) for the Korsmeyer Peppas model was higher than the other models in every occurrence of ISFI (Table 7). It appears that the drug's release follows the Korsmeyer Peppas paradigm as shown in Figure 14. The regression coefficient ( $R^2$ ) value indicates the model's decent correlation fit. Table 8 shows the n value obtained from the graph, whereas in the case of ISM, drug release follows zero-order kinetics with an  $R^2$  value of 0.9824 as shown in Figure 14.

**Table 7.**  $R^2$  and n value of Korsmeyer-peppas model for ISFI formulations

Model/Formulation code	$R^2$ Value			
	F2	F4	F5	EP8
Korsmeyer peppas model	0.9584	<b>0.9773</b>	0.9947	0.9797
n Value	0.2	0.3	0.3	0.2
Drug transport mechanism	Fickian diffusion	Fickian diffusion	Fickian diffusion	Fickian diffusion

**Table 8.**  $R^2$  and n value of Zero order model for ISM formulations

Model/Formulation code	$R^2$ Value			
	F2	F4	F5	EP8
Zero order model	0.918	0.9715	0.9411	<b>0.9824</b>
n Value	0.2	0.3	0.3	0.2
Drug transport mechanism	Fickian diffusion	Fickian diffusion	Fickian diffusion	Fickian diffusion



**Figure 14.** Release kinetics of formulation Zero order release model for ISM (EP8) Korsmeyer peppas model for ISFI (F4)

### Stability Study

Final formulations were tested for stability according to ICH guideline Q1C, as shown in table 9. The ISFI (F4) and ISM (EP8) formulations were held at  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  and  $75\% \pm 5\% \text{RH}$ . The pH and medication content were measured for up to one month. The analysis discovered that raising the temperature greatly reduced the drug concentration in the formulations. Physical features of both formulations were similar; they were both stable, did not change colour, and solidified in the buffer after injection [27].

**Table 9:** Stability of formulations

Temperature of storage	Time	pH		% Drug Content	
		ISFI	ISM	ISFI	ISM
$40 \pm 2^\circ\text{C} \& 75\% \pm 5\% \text{RH}$	Day1	$7.95 \pm 0.054$	$8.11 \pm 0.077$	100	100
	Day15	$7.71 \pm 0.89$	$7.89 \pm 0.054$	98.12	97.74
	Day30	$7.52 \pm 0.81$	$7.81 \pm 0.062$	96.68	96.45

The first burst release of drug within the first 24 hours of therapy is one of the key disadvantages of sustained-release formulations. Levothyroxine depot formulations' high initial drug release boosts the drug serum levels, which can cause serious adverse effects include tachycardia and fatigue. Because the hydrogen bonding between the NMP molecules and the polymer chains in the ISFI formulation hindered NMP from rapidly diffusing into the release medium, resulting in a decreased initial drug release, PLGA polymer was employed in this work to alleviate this problem (controlling the early drug release).

According to our findings, the copolymer and solvent NMP are biodegradable, biocompatible, and capable of delivering the medicine for a long time (30 days *in-vitro* drug release).

ISFI and ISM are biodegradable and biocompatible, requiring no surgical removal after use. As a result, long-acting Levothyroxine sodium formulations (ISFI & ISM) would be a better therapeutic option, allowing dose frequency to be reduced from "per day" to "per week" & "per month." This aids in maintaining a more consistent hormone plasma concentration in the body and lowers patient non-compliance, such as irregular administration, drug-food combinations, missing doses, and so on. This innovative drug delivery method has the potential to safely and effectively distribute different therapeutic compounds, particularly those employed in various chronic illness situations.

## ACKNOWLEDGMENTS

Authors acknowledge sincere thanks to the management and staff of Shree Dhanvantary College of Pharmacy, India, for the facilities granted and constant encouragement for the completion of current research investigation.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: M.G., M.S., R.J.; Design: M.G., R.J.; Control: M.S.; Sources: M.G., R.J. Materials: R.J.; Data Collection and/or Processing: M.G., M.S., R.J.; Analysis and/or Interpretation: M.S., R.J.; Literature Review: R.J.; Manuscript Writing: M.S.; Critical Review: M.S.; Other: M.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 the ethics committee approval is required for this study (Proposal Number: SDPC/AFC/2017/12). The given study was conducted at Shree Dhanvantary pharmacy college, Kim.

## REFERENCES

1. Gaitonde, D.Y., Rowley, K.D., Sweeney, L.B. (2012). Hypothyroidism: an update. *South African Family Practice*, 54(5), 384-390. [\[CrossRef\]](#)
2. Colucci, P., Yue, C.S., Ducharme, M., Benvenga, S. (2013). A review of the pharmacokinetics of levothyroxine for the treatment of hypothyroidism. *European Endocrinology*, 9(1), 40-47. [\[CrossRef\]](#)
3. Hays, M.T. (2007). Parenteral thyroxine administration. *Thyroid*, 17(2), 127-129. [\[CrossRef\]](#)
4. Abdelghany, S., Tekko, I.A., Vora, L., Larrañeta, E., Permana, A.D., Donnelly, R.F. (2019). Nanosuspension-based dissolving microneedle arrays for intradermal delivery of curcumin. *Pharmaceutics*, 11(7), 308. [\[CrossRef\]](#)
5. Sudhakar, M., Kancharla, R., Rao, V.U. (2013). A review on sustained release injectable depot drug delivery systems. *International Journal of Advanced Pharmaceutical Sciences*, 4, 142-158.
6. Sheikh, A.A., Sheikh, S.R. (2016). Advanced injectable drug delivery system: A brief review. *System*, 9(1), 11.
7. Chaker L, Bianco A, Peeters R. (2017). Hypothyroidism. *Lancet*, 390(1), 1550-1562. [\[CrossRef\]](#)
8. Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., Farokhzad, O.C. (2016). Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chemical Reviews*, 116(4), 2602-2663. [\[CrossRef\]](#)
9. Liechty, W.B., Kryscio, D.R., Slaughter, B.V., Peppas, N.A. (2010). Polymers for drug delivery systems. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 1(1), 149-173. [\[CrossRef\]](#)
10. Joshi, J.R., Patel, R.P. (2012). Role of Biodegradable Polymers in Drug Delivery. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 4(2), 74-81.
11. Song, R., Murphy, M., Li, C., Ting, K., Soo, C., Zheng, Z. (2018). Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. *Drug Design, Development and Therapy*, 12(1), 3117-3145. [\[CrossRef\]](#)



12. Singh, G., Kaur, T., Kaur, R., Kaur, A. (2014). Recent biomedical applications and patents on biodegradable polymer-PLGA. *International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Science*, 1(2), 30-42.
13. Han, F.Y., Thurecht, K.J., Whittaker, A.K., Smith, M.T. (2016). Bioerodable PLGA-based microparticles for producing sustained-release drug formulations and strategies for improving drug loading. *Frontiers in Pharmacology*, 7(1), 185. [\[CrossRef\]](#)
14. Madan, M., Bajaj, A., Lewis, S., Udupa, N., Baig, J.A. (2009). *In situ* forming polymeric drug delivery systems. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(3), 242-251. [\[CrossRef\]](#)
15. Patel, B., Chakraborty, S. (2016). Biodegradable polymers: emerging excipients for the pharmaceutical and medical device industries. *Journal of Excipients and Food Chemicals*, 4(4), 1010.
16. Kapoor, D.N., Bhatia, A., Kaur, R., Sharma, R., Kaur, G., Dhawan, S. (2015). PLGA: A unique polymer for drug delivery. *Therapeutic Delivery*, 6(1), 41-58. [\[CrossRef\]](#)
17. Makadia, H.K., Siegel, S.J. (2011). Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3(3), 1377-1397. [\[CrossRef\]](#)
18. Avachat, A.M., Kapure, S.S. (2014). Asenapine maleate *in situ* forming biodegradable implant: An approach to enhance bioavailability. *International Journal of Pharmaceutics*, 477(1-2), 64-72. [\[CrossRef\]](#)
19. Ahmed, T.A., Ibrahim, H.M., Samy, A.M., Kaseem, A., Nutan, M.T., Hussain, M.D. (2014). Biodegradable injectable *in situ* implants and microparticles for sustained release of montelukast: *In vitro* release, pharmacokinetics, and stability. *AAPS PharmSciTech*, 15(3), 772-780. [\[CrossRef\]](#)
20. Algin-Yapar, E., Ari, N., Baykara, T. (2014). Evaluation of *in vitro* and *in vivo* performance of granisetron *in situ* forming implants: effect of sterilization, storage condition and degradation. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(3), 319-325. [\[CrossRef\]](#)
21. Bindu, R., Srinivas, P., Ravindrababu, D. (2015). Formulation and characterization of parenteral *in situ* implants of tariquidar bimesylate. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(1), 2028-2034.
22. Patel, R.B., Carlson, A.N., Solorio, L., Exner, A.A. (2010). Characterization of formulation parameters affecting low molecular weight drug release from *in situ* forming drug delivery systems. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 94(2), 476-484. [\[CrossRef\]](#)
23. Yehia, S.A., Abdel-Halim, S.A., Aziz, M.Y. (2017). Formulation and evaluation of injectable *in situ* forming microparticles for sustained delivery of lornoxicam. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(2), 319-328. [\[CrossRef\]](#)
24. Costa, P., Lobo, J.M.S. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 123-133. [\[CrossRef\]](#)
25. Shaikh, H., Kshirsagar, R. (2015). Mathematical models for drug release characterization: A review. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(4), 324-338.
26. Shintani, S., Yamazaki, M., Nakamura, M., Nakayama, I. (1967). A new method to determine the irritation of drugs after intramuscular injection in rabbits. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 11(2), 293-301. [\[CrossRef\]](#)
27. Bajaj, S., Singla, D., Sakhuja, N. (2012). Stability testing of pharmaceutical products. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(3), 129-138. [\[CrossRef\]](#)



## PİYASADA BULUNAN BAZI UÇUCU YAĞLARIN FARMAKOPE UYGUNLUĞUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

### EVALUATION OF PHARMACOPOEIA COMPLIANCE OF SOME ESSENTIAL OILS IN THE MARKET

Burçin ERGENE<sup>1</sup> , Damla HADDUR<sup>2</sup> , Melek KARAASLAN<sup>1\*</sup> ,  
Kamuran İLERİ ÖZLER<sup>1,2</sup> , Gülçin SALTAN İŞCAN<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognози Ana Bilim Dalı, 06560, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 06110, Ankara, Türkiye

#### ÖZ

**Amaç:** Uçucu yağlar; doğal kaynaklardan elde edilen ve vücutta fizyolojik etkilere sebep olan karışımlardır. Bu etkiler, uçucu yağın kimyasal bileşimine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bu nedenle, kullanılacak uçucu yağların dikkatli seçilmesi, beklenen etkinin görülebilmesi adına son derece önemlidir. Piyasada satılan uçucu yağların kaynağına ve kalitesine dair doğru bilgiye ulaşmak ise her zaman mümkün olmamaktadır. Fitoterapi ve aromaterapide terapötik ajan olarak, kimyasal içeriği bilinen ya da farmakope kalitesinde olan uçucu yağlar tercih edilmektedir. Bu uçucu yağlar; ağrı, uykusuzluk, egzema, stres nedeniyle anksiyete, depresyon ve hazımsızlık gibi ruhsal ve fiziksel rahatsızlıklarda etkin bir şekilde kullanılmaktadır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışma kapsamında; 10 adet lavanta uçucu yağı numunesi, 8 adet biberiye uçucu yağı numunesi, 10 adet limon uçucu yağı numunesi, 8 adet nane uçucu yağı numunesi, 9 adet bergamot uçucu yağı numunesi ve 6 adet fesleğen uçucu yağı numunesi olmak üzere, piyasada satışı olan 16 markanın, toplamda 51 adet uçucu yağının farmakope analizi yapıldı. Lavanta, biberiye, nane ve limon uçucu yağları için Türk Farmakopesi (2017), bergamot uçucu yağı için Fransız Farmakopesi (1991), fesleğen uçucu yağı için ise AFNOR Fransız Standartlarında yer alan monograflar doğrultusunda analiz şartları belirlendi. Fesleğen için elde edilen sonuçlar, Randriamiorisoa, 1995 (Manuel Rapide Et Utile Pour Producteurs D'Huiles Essentielles) içeriğindeki referans değerler ile de karşılaştırıldı.

**Sonuç ve Tartışma:** Piyasadan temin edilen numunelerle yapılan farmakope analizleri sonucunda elde edilen veriler ışığında; analizi yapılan uçucu yağlar arasında; lavanta uçucu yağı numunelerinden 3 tanesinin ve biberiye uçucu yağı numunelerinden 1 tanesinin farmakopeye tam

\* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Melek Karaaslan  
e-posta / e-mail: mkaracaoglu@ankara.edu.tr, Tel. / Phone: +903122033103

olarak uygun sonuç verdiği, diğer uçucu yağ numunelerinin ise istenen spesifikasyonları tam olarak sağlamadığı görülmüştür. Numunesi temin edilen yağların farmakope analizi sonuçları, piyasadaki pek çok yağın farmakope kalitesinde olmadığını ortaya koymuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Aromaterapi, farmakope analizi, Türk Farmakopesi, uçucu yağ

## ABSTRACT

**Objective:** Essential oils are mixtures, which are obtained from natural sources and induce some physiological effects in the body. These effects vary due to the chemical content of the essential oil. Therefore, selection of essential oils to be used is extremely important in order to see the expected effect. It is not always possible to obtain accurate information about the source and quality of essential oils sold in the market. Essential oils with known chemical content or pharmacopoeial quality are preferred as therapeutic agents in phytotherapy and aromatherapy. These oils are effectively used in mental and physical disorders such as headache, pain, insomnia, eczema, stress-induced anxiety, depression and indigestion.

**Material and Method:** In the content of current study, pharmacopoeia analyses of a total of 51 essential oils of 16 brands sold in the market, which comprise 11 lavender essential oil, 8 rosemary essential oil, 10 lemon essential oil, 8 peppermint essential oil, 9 bergamot essential oil and 6 basil essential oil samples, were conducted. Analysis conditions were determined in accordance with the monographs of Turkish Pharmacopoeia (2017) for lavender, rosemary, peppermint and lemon essential oils; French Pharmacopoeia for bergamot essential oil (1991), and AFNOR French Standards for basil essential oil. Results for basil were also compared with reference values in Randriamiorisoa, 1995 (Manuel Rapide Et Utile Pour Producteurs D'Huiles Essentielles).

**Result and Discussion:** In the light of the data obtained as a result of the pharmacopoeia analyses conducted with the samples obtained from the market; it was observed that 3 of the lavender essential oil samples and 1 of the rosemary essential oil samples possess full compliance with the pharmacopoeia, while the other essential oil samples did not fully meet the desired specifications. The results of the pharmacopoeia analysis of the essential oil samples revealed that many oils on the market do not meet the standards of pharmacopoeia.

**Keywords:** Aromatherapy, essential oil, pharmacopoeia analysis, Turkish Pharmacopoeia

## GİRİŞ

Aromaterapi kısaca; bazı rahatsızlıkları gidermek veya bazı fizyolojik etkiler gözlemek amacıyla, uçucu yağların kullanımı şeklinde tanımlanabilir. Özellikle 21. yüzyılda ilgi çeken ve yaygınlaşan geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamaları arasında aromaterapi de kullanılmaktadır. Aromaterapide; fizyolojik etkinin gözlenmesi için terapötik ajan olarak, bitkilerin çiçekleri, dalları, yaprakları, meyveleri, kökleri gibi farklı kısımlarından veya reçine gibi ürünlerinden elde edilen uçucu yağlar kullanılmaktadır [1]. Uçucu yağlar ise; bu doğal kaynaklardan elde edilen, mental, ruhsal ve fizyolojik iyileşme sağlayan ve uçucu bileşikleri taşıyan karışımlardır. Bu bileşikler, bitkilerde buldukları kısma ve kullanım amacına göre distilasyon, mekanik yöntemler, çözücü ekstraksiyonu gibi farklı şekillerde elde edilmekte olup; tedavi amacının yanı sıra farmasötik ilaç formlarının bileşiminde, kozmetik ürünlerin bileşiminde, iyi yaşam, iyilik hali (wellness-wellbeing) uygulamalarında, koku verici olarak oda spreyi gibi günlük kullanım ürünlerinde ve aromatan olarak gıda sektöründe de kullanılmaktadır [2]. Bu kuvvetli kokulu ve yağimsı karışımlar; hidrofobiklik, bozunmaya yatkınlık ve uçuculuk gibi zayıf fiziksel özelliklere sahiptir ve bu durum da uçucu yağların farmasötik uygulamalarda kullanılmasını ve bozulmadan muhafaza edilmesini zorlaştırmaktadır [3]. Aromaterapide uçucu yağların iki ana uygulama yolu; inhalasyon ve dermal yoldur. Her bir yöntemde uçucu yağı oluşturan bileşenler; dolaşım sistemine farklı hızda ve farklı miktarlarda absorbe olurlar [4].

Birçok uçucu yağın biyolojik etkinliğine ait ilk bilgiler, bilimsel kanıtlar olmaksızın, sadece gözlemlenerek elde edilmiş olup; nesilden nesile aktarılmıştır. Örneğin, geleneksel olarak kullanımı olan biberiye ve nane uçucu yağlarının merkezi sinir sistemi üzerinde uyarıcı etkiye sahip olduğu; ylang ylang ve lavanta uçucu yağlarının ise tam tersi sedatif etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir [5]. Ancak fizyolojik etkiler, tamamen doğal yöntemlerle elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşimine bağlıdır. Uçucu yağlar, satışı serbest olan ve maalesef piyasada içeriğine, kaynağına ve kalitesine dair doğru bilgiye her zaman ulaşılabilen ürünlerdir. Bu nedenle öncelikle aromaterapi için kullanılacak uçucu



yağların gıda ve kozmetik endüstrisinde kullanılanlardan farklı olduğunu göz önünde bulundurmak gerekir. Fitoterapi ve aromaterapide terapötik ajan olarak, kimyasal içeriği bilinen ya da farmakope kalitesinde olan uçucu yağlar; ağrı, uykusuzluk, egzema, stres nedenli anksiyete, depresyon ve hazımsızlık gibi ruhsal ve fiziksel rahatsızlıklarda etkin bir şekilde kullanılmaktadır [6-8].

Aromaterapide yaygın olarak kullanılan yağlardan olan lavanta uçucu yağı, özellikle masaj ve inhalasyon yolu ile halk arasında ve son yıllarda iyi yaşam, iyilik hali (wellness-wellbeing) tesislerinde rahatlatıcı, sakinleştirici etkisi ile kullanılmaktadır. Bu etkisiyle zihinsel olarak aşırı uyarılmışlık ve gerginlik halinin giderilmesinde, anksiyeteye karşı, uyku problemlerinin önlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında, yara, yanık ve bazı cilt rahatsızlıklarının tedavisinde kullanımı da kayıtlarda mevcuttur. Yapılan çalışmalar doğrultusunda, antibakteriyel ve antifungal etkinliği olduğu tespit edilmiştir [1]. Ayrıca lavanta uçucu yağının merkezi sinir sistemi üzerinde sedatif etkili olduğu da çalışmalar sonucunda gösterilmiştir [5]. Nane yağı, doğrudan cilde uygulanması durumunda tahrişe neden olabilmektedir, ancak eklem ağrısına ve spazm ağrılarına karşı kullanılan pek çok merhem formülasyonuna dahil edilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda; antienflamatuvar, astrenjan, antispazmodik, analjezik, antimikrobiyal etkileri yanında karminatif, stomaşik ve dekonjestan etkileri de gözlenmiştir. Uygun şekilde seyreltilmesinin ardından, özellikle baş ve şakaklara uygulanmak suretiyle baş ağrısına karşı kullanımı oldukça yaygındır [1]. Merkezi sinir sistemi üzerine stimüle edici etkisi olduğu bilinmektedir [5]. Bunun yanında inhalasyon yoluyla sinus ve nefes açıcı olarak kullanılmaktadır. Biberiye uçucu yağı, özellikle sindirim sistemi üzerine etkisiyle dikkat çekmektedir. Sindirim sorunları, kabızlık ve kolite karşı kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra merkezi sinir sistemini uyarıcı etki gösterdiği, canlandırıcı etkisi ile aromaterapide kullanıldığı bilinmektedir [1,5]. Limon uçucu yağı, astrenjan ve antiseptik etkisi ile bilinmektedir. Aromaterapide ise ruh halinin iyileştirilmesi amacıyla kullanılmaktadır [1]. Bergamot uçucu yağı, anksiyolitik, analjezik, antienflamatuvar, antimikrobiyal etkinlik göstermektedir [9]. Stres, anksiyete ve uyku problemlerine karşı kullanılmaktadır. Benzer şekilde, aromaterapide fesleğen uçucu yağından da anksiyete ve stresi gidermede yararlanılmaktadır. Ayrıca fesleğen uçucu yağı zihin açıcı olarak da kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda antimikrobiyal etkinliği gösterilmiştir [1].

Farmakopeler; tedavi maksatlı kullanılan veya bir formülasyona yardımcı madde olarak dahil edilen doğal veya sentetik ürünlerin kullanılabilmesi için taşınması gereken standartların verildiği monografları içeren, devlet otoritesi tarafından kabul edilmiş ve bu konuda resmi kaynak niteliğindeki kitaplardır. Bu kitaplar; gelişen teknikler ve kullanılan etkili ve yardımcı maddelerin, doğal kaynaklı ürünlere yenilerinin eklenmesine bağlı olarak, yıllar içinde güncellenmektedir [10]. Tıbbi bitkiler ve bu bitkilerden elde edilen ürünlerin kalitesi, güvenilirliği ve etkinliği de ancak belli standartlara sahip olmaları ile sağlanabilir. Bu amaçla kullanılacak monografları içeren kaynak kitaplara örnek olarak; Türk Farmakopesi 2017 (Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu), Avrupa Farmakopesi, ESCOP Monografları, Komisyon E Monografları gibi pek çok kaynak verilebilir.

Uçucu yağlar, ilaç, gıda, kozmetik gibi pek çok sektörde kullanılmakla birlikte; kaynak bitkinin nadir bulunması, hasata dair sorunlar, elde edilen ürünün iklime bağlı olarak değişkenlik göstermesi ve ekstraksiyon verimi gibi konular nedeniyle yüksek maliyetli ürünlerdir. Bu nedenle, satıcı firmalar tarafından, maliyeti düşürmek ve standart kokuyu sağlama amacıyla, uçucu yağ yerine sentetik bileşik karışımlarını pazarlanması, uçucu yağın bileşimine sentetik bileşikler katılması veya yağın başka yağlarla katıştırılması durumu söz konusu olabilmektedir. Bitkisel yağlar, daha ucuz ve kolay erişilebilir olmaları, ayrıca yoğunluklarının uçucu yakın olması nedeniyle uçucu yağları katıştırmada sıklıkla tercih edilmektedir. Genellikle insan sağlığını tehdit etmeyen bu durumda, uçucu yağ seyrelmekte ve koku şiddeti azalmaktadır. Bazı durumlarda uçucu yağın içine sentetik veya doğal kaynaklı bileşikler eklenebilmektedir. Bunun amacı yağın belli spesifikasyonları sağlaması, daha yüksek fiyatlandırılması amacıyla spesifik maddelerin miktarının artırılması veya koku ya da etkinliğinin artırılması olabilmektedir. Uçucu yağların maliyetini düşürürken kokusundan ödün vermemek amacıyla, yüksek maliyetli uçucu yağların daha düşük maliyetli olanlarla karıştırılması da söz konusudur. *Lavandula angustifolia* Mill. uçucu yağının kokusunu arttırmak için farklı lavanta türlerinin uçucu yağı ile katıştırılabilmekte veya içine sentetik linalool ve linalil asetat bileşikleri ilave edilmesi veya papatya uçucu yağının etkinliğini arttırmak amacıyla içine sentetik bisabolol bileşiği ilave edilmesi bu durumlara örnek olarak verilebilir [11]. Bu tip ürünlerin “tamamen doğal uçucu yağ” adı altında satılması doğru

değildir. Halk arasında oldukça yaygın olarak kullanılan uçucu yağlara dair bazı satıcı firmalar tarafından yapılan bu suistimal, uçucu yağların kalitesini ve içeriğini değerlendiren analizlere önem kazandırmaktadır.

Bu çalışma kapsamında; piyasada satılan ve halk arasında yaygın olarak kullanılan bazı uçucu yağların farklı markalara ait örnekleri temin edilmiş ve bu örneklerin farmakope analizleri yapılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Çalışma Materyali

Farklı markalardan temin edilen 10 adet lavanta uçucu yağı numunesi, 8 adet biberiye uçucu yağı numunesi, 10 adet limon uçucu yağı numunesi, 8 adet nane uçucu yağı numunesi, 9 adet bergamot uçucu yağı numunesi ve 6 adet fesleğen uçucu yağı numunesi olmak üzere, piyasada satışı olan 16 markanın, toplamda 51 adet uçucu yağının farmakope analizi yapıldı. Numunelerin temin edilmesini takiben marka etiketleri kapatılarak her markaya bir harf kodu verilmiştir. Çalışma kapsamında analizi yapılmak üzere seçilen uçucu yağlar Tablo 1’de verilmiştir.

**Tablo 1.** Analiz için seçilen uçucu yağlar ve numune sayısı

Uçucu yağ	Bitki (Latince)/yağ elde edilen kısım	Numune sayısı
Lavanta	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill. Çiçekli üst kısımları	10
Biberiye	<i>Rosmarinus officinalis</i> L. Çiçekli toprak üstü kısımları	8
Fesleğen	<i>Ocimum basilicum</i> L. Taze çiçek ve yapraklar	6
Limon	<i>Citrus limon</i> (L.) Osbeck Taze kabukları	10
Nane	<i>Mentha piperita</i> L. Taze toprak üstü kısımları	8
Bergamot	<i>Citrus bergamia</i> Risso & Poit. Taze meyve perikarpı	9

### Numunelerin Standarda Uyumluluğunun Analizi

Lavanta, biberiye, nane ve limon uçucu yağları için Türk Farmakopesi (2017) [12], bergamot uçucu yağı için Fransız Farmakopesi (1991) [13], fesleğen uçucu yağı için ise AFNOR Fransız Standartlarında (Association Française de Normalisation) yer alan monograflar [14] doğrultusunda analiz şartları belirlendi. Fesleğen için elde edilen sonuçlar, Randriamiorisoa (1995) (Manuel Rapide Et Utile Pour Producteurs D’Huiles Essentielles) [15] içeriğindeki referans değerler ile de karşılaştırıldı.

Referans alınan kaynaklara göre numuneler üzerinde gerçekleştirilen analizler Tablo 2’de verilmiştir.

Yapılan laboratuvar testleri sonucunda farmakope kalitesine uygun bulunan uçucu yağların, gaz kromatografisi ile içerik analizi yapıldı ve sonuçlar referans alınan kaynaklarda bulunan veriler ışığında değerlendirildi.

Analiz için GC-MS sistemi (Agilent 7890B GC 5977B Mass Selective Detector System) ve stasyonere faz olarak HP Innowax column (60 m × 0.25 mm iç çap × 0.25 µm film kalınlığı) kullanıldı. Enjeksiyon 250°C sıcaklıkta gerçekleştirildi ve taşıyıcı gaz olarak kullanılan akış hızı 0,7 ml/dak olacak şekilde ayarlandı. Bileşiklerin tespiti için elektron iyonizasyon sistemi (70 eV) ve 230°C sıcaklıkta, 35-450 m/z kütle aralığında tarama yapan iyon kaynağı kullanıldı. Ayrılan bileşikler “Wiley 9-Nist 11 Mass Spectral Database” veri bankası kullanılarak tanımlandı.

Analiz sırasında kullanılan sıcaklık programına göre; kolon sıcaklığı başlangıçta 10 dakika süreyle 60°C olacak şekilde ayarlandı. Analiz süresince kolon sıcaklığı önce dakikada 4°C artırılarak 220°C’ye çıkarıldı. Bunun ardından kolon sıcaklığı, sıcaklık artışı dakikada 1°C olacak şekilde

240°C'ye kadar yükseltildi. Enjeksiyon ünitesi ve dedektör sıcaklığı 250°C olarak ayarlandı.

**Tablo 2.** Referans alınan kaynaklara göre, uçucu yağ numunelerinde yapılan analizler

	Lavanta	Biberiye	Limon	Nane	Bergamot	Fesleğen
Görünüm	+	+	+	+	+	+
Çözünürlük				+		
İnce tabaka kromatografisi	+	+	+	+	+	
Bağlı yoğunluk	+	+	+	+	+	+
Kırılma indeksi	+	+	+	+	+	+
Optik çevirme	+	+	+	+	+	+
Asitlik değeri	+	+		+	+	+
Absorbans			+		+	
Reçineleşmiş uçucu yağlar			+	+		
Buharlaşmada kalıntı			+			

## SONUÇ VE TARTIŞMA

### Lavanta Uçucu Yağı Numunelerinin Analizi

Türk Farmakopesi (2017)'de, farmakopeye uygun bir lavanta uçucu yağı numunesinin ince tabaka kromatografisi (İTK) uygulaması sonucu elde edilen profilinde şahit çözeltileri olarak linalol, linalil asetat ve 1,8-sineol kullanılmaktadır. Farmakopeye göre; anisaldehit sülfürik asit reaktifi püskürtülen uçucu yağın uygulandığı plakta, bu lekeler dışında, linalil asetat lekesi üzerinde, fronta noktasına yakın menekşe-kırmızı veya yeşilimsi-kahverengi bir leke, starta yakın gözlenen çeşitli ayrılmamış lekeler üzerinde ise zayıf sarımsı-kahverengi bir leke gözlenmelidir. Analizi yapılan numunelerden 2 tanesinde 1,8-lineole ait leke gözlenmezken, bir tanesinde fronta yakın menekşe-kırmızı renkli leke tespit edilememiştir. Bir numunede ise sadece ökaliptole ait leke ve front noktasındaki menekşe renkli leke gözlenmiş ancak başka leke tespit edilememiştir. Özetle; yapılan analizler doğrultusunda, numunelerden 4 tanesinin İTK profillerinde, farmakopede görülmesi gerektiği belirtilen lekelerin bir kısmı gözlenmemiştir.

İki numunenin optik çevirme değerleri (-5.22) ve (-4.02) olarak tespit edilmiş ve bu değerler farmakopede verilen (-12.5°)-(-6°) aralığı dışında kaldığı için numuneler optik çevirme derecesi bağlamında değerlendirildiğinde farmakopeye uygun bulunmamıştır.

**Tablo 3.** Lavanta uçucu yağı numunelerinin analiz sonuçlarının referans değerler ile uyumluluğu

	İnce tabaka kromatografisi	Bağlı yoğunluk	Kırılma indeksi	Optik çevirme	Asitlik değeri
Marka A	+	+	+	+	+
Marka B	+	+	+	+	+
Marka C	+	+	+	-	-
Marka D	+	+	+	+	-
Marka E	+	+	+	-	+
Marka G	+	+	+	+	+
Marka H	-	+	+	+	+
Marka J	-	+	+	*	+
Marka L	-	+	+	+	-
Marka M	-	+	+	*	-

\* Ölçüm için yeterli numune tedarik edilememiştir.

Farmakopede numunenin asitlik değerinin en fazla 1.0 olması gerektiği bildirilmiştir. Asitlik derecesi tayin edilen numuneler arasında iki tanesinin asitlik değeri 2.12 ve 1.60 bulunmuş, diğer numuneler için bu değer, verilen en yüksek değer olan 1.0'ın altında olduğu tespit edilmiştir.

Çalışılan örnekler ile elde edilen değerlerin referans değerler ile uyumluluğu Tablo 3'te özetlenmiştir.

Lavanta uçucu yağı için yapılan farmakope analizi sonuçları doğrultusunda Marka A, B ve G numuneleri uygun bulunmuş ve bu numunelerin GC-MS verileri incelenmiştir. Buna göre Marka A numunesinde miktarı belirlenen maddeler farmakope sınırları dahilinde olup; numunenin firmalardan tedarik edilen GC-MS analizi raporlarında; farmakopede sınır değerleri belirtilen 3-oktanon bileşiğinin miktarına dair veri bulunmamaktadır. B numunesindeki kafur miktarının, farmakopede en yüksek değer olarak verilen %1.2'den yüksek olduğu görülmüştür. H numunesinin GC-MS verileri ise farmakopede sınır değerleri verilen tüm bileşikler kapsamakta olup, bu numuneye ait sonuçlar farmakope değerlerine uygunluk göstermektedir. A numunesinin GC-MS analizi yapıldığında; lavandulol bileşiği haricinde, içerdiği bileşikler ve miktarları bakımından Türk Farmakopesi 2016'da verilen standartlara uygundur. TF2016'da lavandulol için verilen değer en az %0.1 iken; analize gönderilen numunede bu değer %0.5'in altında bulunmuştur. Ancak numuneyi tedarik eden firmanın aynı laboratuvara gönderdiği numunesinde bu değer de farmakope standartlarına uygun çıkması, farklı dönemlerde üretilen uçucu yağların içeriğinde küçük değişiklikler olabildiğini göstermiştir.

### **Biberiye Uçucu Yağı Numunelerinin Analizi**

Türk Farmakopesi (2017)'de, farmakopeye uygun bir biberiye uçucu yağı numunesinin İTK uygulaması sonucu elde edilen profilinde şahit çözelti olarak borneol, bornil asetat ve sineol kullanılmaktadır. Farmakopeye göre; vanilin sülfürik asit rektifi püskürtülen plakta, uçucu yağın uygulanması ile elde edilen kromatogramda, fronta yakın yoğun menekşe bir leke ve bunun altında menekşe-gri bir leke gözlenmelidir. Şahit çözeltide bulunan maddelerle aynı Rf değerine sahip lekelerin yanı sıra; standart olarak temin edilememiş olsa da farmakopedeki verilere dayanarak sineol'e ait olduğu düşünülen yoğun mavi leke tüm numunelerde tespit edilmiştir. Bir numunede (Marka J) bornil asetat ile aynı Rf değerlerine sahip bir leke görülmemiştir. Bunun dışında bir numunede (Marka I) bornil asetata ait lekenin altında belirgin menekşe leke gözlenmemiş olmakla birlikte, bu lekenin oldukça yoğun görülen sineol lekесinin altında maskelenmiş olabileceği düşünülmüştür. Tüm numunelerde front noktasında olması beklenen menekşe renkli leke tespit edilmiştir. Marka M numunesinde ise, farmakopeye uygun konsantrasyonda uygulanmış olmasına rağmen, tüm lekeler çok zayıf şekilde gözlenmiştir.

Bir numunenin optik çevirme değeri (-5.22) olarak tespit edilmiş ve bu değer farmakopede verilen (-5°)-( +8) aralığı dışında kaldığı görülmüştür.

Bir numunenin 1.474 olarak tespit edilen kırılma indisi farmakopede verilen sınır değerler olan 1.464-1.473 aralığının dışında olduğu görülmüştür.

Farmakopede numunenin asitlik değerinin en fazla 1.0 olması gerektiği bildirilmiştir. Asitlik derecesi tayin edilen numuneler arasında dört tanesinin asitlik değeri 1.94; 1.15; 2.34 ve 1.06 olarak tespit edilmiş ve bu değerlerin farmakopeye uygun olmadığı görülmüştür.

Çalışılan örnekler ile elde edilen değerlerin referans değerler ile uyumluluğu Tablo 4'te özetlenmiştir.

Biberiye uçucu yağı için yapılan farmakope analizi sonuçları doğrultusunda B numunesi uygun bulunmuş ve bu numunenin firmadan tedarik edilen GC-MS verileri incelenmiştir. Bu numunenin analiz raporunda; farmakopede sınır değerleri belirtilen borneol ve verbenon bileşiklerinin miktarına dair veri bulunmamaktadır. Bunun yanında, farmakopede sınır değerleri verilen maddelerden  $\beta$ -mirsen, limonene, p-simen ve kafur bileşiklerinin miktarları uygun bulunmamıştır. Marka K numunesinin GC-MS analizi; numunenin Türk Farmakopesi 2016'da Fas-Tunus tipi biberiye uçucu yağı için verilen standartlara uygun olduğunu göstermiştir.

**Tablo 4.** Biberiye uçucu yağı numunelerinin analiz sonuçlarının referans değerler ile uyumluluğu

	İnce tabaka kromatografisi	Bağlı yoğunluk	Kırılma indeksi	Optik çevirme	Asitlik değeri
<b>Marka B</b>	+	+	+	+	+
<b>Marka C</b>	+	+	+	-	-
<b>Marka D</b>	+	+	+	+	*
<b>Marka I</b>	-	+	+	+	-
<b>Marka J</b>	-	+	+	+	-
<b>Marka K</b>	+	+	+	+	-
<b>Marka L</b>	+	+	+	+	+
<b>Marka M</b>	+	+	-	+	+

\* Ölçüm için yeterli numune tedarik edilememiştir.

### Nane Uçucu Yağı Numunelerinin Analizi

Türk Farmakopesi (2017)'de, farmakopeye uygun bir nane uçucu yağı numunesinin İTK uygulaması sonucu elde edilen profilinde şahit çözelti olarak timol, mentil asetat, 1,8-sineol ve mentol kullanılmaktadır. Farmakopeye göre; test çözeltisinin kromatogramında bileşikler dışında limonen, menton, mentofuran, izomenton lekeleri ile front noktasına yakın ve hidrokarbonlara ait yoğun mor-kırmızı leke gözlenmektedir. Bunlardan başka izopulegol, pulegon ve karvona ait lekeler de test çözeltisinin kromatogramında gözlemlenebilmektedir. Çalışmada İTK plağına menton, karvon, mentofuran, pulegon standartları da ayrıca uygulanmış ve Rf değerleri numunedeki lekelerle kıyaslanmıştır. Numunelerin tümünde mentol saptanmış ancak Marka B, F ve J numunelerinde şahit çözeltideki 1,8-sineol ile aynı Rf değerine sahip lekeler gözlenmemiştir. Ayrıca Marka J numunesinin kromatogramında, karvon, menton, mentofuran ve pulegon ile aynı Rf değerine sahip leke gözlenmezken; Marka B, D, F numunelerinde de mentofurana ait kahverengi-sarı leke tespit edilmemiştir. Marka I numunesinde; karvon ve menton ile aynı Rf değerine sahip leke gözlenmiştir. Ancak anisaldehit reaktifi püskürtülmesi sonucu karvon ile aynı Rf değerine sahip lekenin farklı renklenmesi dolayısıyla, bu lekenin karvona ait olmadığı kararına varılmıştır. Farmakopedeki verilere de bakılarak numunede pulegon ve izomenton varlığının söz konusu olabileceği görülmüştür. Menton lekesinin hemen üstünde görülen mavi lekenin mentil asetat lekesi olabileceği, farmakope verilerine dayanılarak söylenebilmektedir. Plağın front noktasında hidrokarbonlara ait olabilecek mor bir leke gözlenmiş, aynı Rf değerine sahip mentofuran standardının lekesinin farklı renkte olduğu görülmüştür. Numuneye ait kromatogramda, mentol ve 1,8-sineol arasında, farmakopede olmaması gerektiği belirtilen mavi leke görülmektedir. Marka K ve L numuneleri kromatogramında, karvon ile aynı Rf değerine sahip leke gözlenmiştir. Menton lekesinin hemen üstünde görülen mavi lekenin mentil asetat lekesi olabileceği, farmakope verilerine dayanılarak söylenebilmektedir. Plağın front noktasında hidrokarbonlara ait olabilecek mor bir leke gözlenmiş, aynı Rf değerine sahip mentofuran standardının lekesinin farklı renkte olduğu görülmüştür. Marka M numunesinde ise, anisaldehit püskürtüldüğünde 1,8-sineole ait leke gözlenmiş ancak farmakopede olduğu bildirilen diğer maddelere ait lekeler tespit edilememiştir.

**Tablo 5.** Nane uçucu yağı numunelerinin analiz sonuçlarının referans değerler ile uyumluluğu

	Çözünürlük	İnce tabaka kromatografisi	Bağlı yoğunluk	Kırılma indeksi	Optik çevirme	Asitlik değeri	Reçineleşmiş uçucu yağlar
<b>Marka B</b>	+	-	+	+	+	+	+
<b>Marka D</b>	+	-	+	+	*	+	+
<b>Marka F</b>	+	-	+	+	-	+	+
<b>Marka I</b>	+	-	+	+	+	+	+
<b>Marka J</b>	+	-	+	+	-	+	+
<b>Marka K</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>Marka L</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>Marka M</b>	+	-	+	-	+	+	+

\* Ölçüm için yeterli numune tedarik edilememiştir.

Optik çevirme derecesi için kabul edilebilir aralık, farmakopede (-30)-(-10) olarak belirtilmiş olup; iki numune (-31.34) ve (-49.98) değerleri ile bu aralığın dışında kalmıştır.

Bir numunenin kırılma indisi 1.456 olarak tespit edilmiş ve bu değer farmakopede verilen sınır değerler olan 1.457-1.467 aralığının dışında olduğu görülmüştür.

Çalışılan örnekler ile elde edilen değerlerin referans değerler ile uyumluluğu Tablo 5'te özetlenmiştir.

GC-MS analizi sonucunda; nane uçucu yağı, mentofuran bileşiği haricinde, içerdiği bileşikler ve miktarları bakımından Türk Farmakopesi 2016'da verilen standartlara uygun bulunmuştur. TF 2016'da mentofuran için verilen değer aralığı %1.0-8.0 iken; GC-MS analizi yapılan Marka M numunesinde bu değer %0.8 olarak bulunmuştur. Tedarikçi firmadan alınan numuneye ait GC analiz raporunda ise bu değer %1.05 olduğu görülmüştür.

### Limon Uçucu Yağı Numunelerinin Analizi

Türk Farmakopesi (2017)'de, farmakopeye uygun bir limon uçucu yağı numunesinin İTK uygulaması sonucu elde edilen profilinde şahit çözelti olarak sitropten ve sitral kullanılmaktadır. Farmakopeye göre; şahit çözeltinin kromatogramındaki lekelerin yanı sıra, test çözeltisinin kromatogramında front noktasına yakın bergamotine ait sönen bir leke, sitral ve sitroptene ait lekeler arasında 5-geraniloksi-7-metoksikumarine ait koyu mavi bir leke ve start noktasına ait biakanjelisin ve bir psörolen türevine ait lekeler gözlenmektedir.

Plağın yukarı kısmında görülmesi beklenen bergamotine ait sarı floresan leke Marka B, D, F, I ve J numunelerinde görülmemiştir. Marka B, D ve F numunelerinde farmakopede belirtilen plağın alt kısımlarında görülmesi beklenen psoralen türevi ve biakanjelisine ait lekeler görülmemiştir. Marka H numunesinde sitrale ait sönen leke gözlenirken 365 nm'de herhangi bir leke gözlenmemiştir. Bununla birlikte Marka I numunesinde, farmakopede verilen bilgiye göre, plağın alt kısımda görülmesi beklenen lekeler tespit edilememiş; Marka M numunesinde ise sadece sitrale ait leke tespit edilebilmiştir.

Optik çevirme derecesi için kabul edilebilir aralık, farmakopede (+57°)-(+70°) olarak belirtilmiş olup; numunelerden 8 tanesinin ölçümü sonucu bulunan değerler bu aralığın dışında kalmıştır.

Farmakopeye göre kırılma indisi için verilen sınır değerler 1.473-1.476 iken, 7 numunenin kırılma indisinin bu aralığının dışında olduğu görülmüştür.

Numunelerin UV absorpsiyonlarının ölçüldüğü analizde; Marka C, J, K ve M numunelerinden absorpsiyon hesaplaması için uygun bir spektrum elde edilemezken; Marka F ve H numunelerinin ölçüm sonuçları sırasıyla 0.11 ve 0.05 olarak hesaplanmış ve farmakopede verilen 0.20-0.96 aralığının dışında kalmıştır.

Analizi yapılan numunelerden 3 tanesinin buharlaşmada kalıntı yüzdeleri, farmakopede verilen sınır değerler olan %1.8-3.6 aralığının üzerinde bulunmuştur.

Çalışılan örnekler ile elde edilen değerlerin referans değerler ile uyumluluğu Tablo 6'da özetlenmiştir.

**Tablo 6.** Limon uçucu yağı numunelerinin analiz sonuçlarının referans değerler ile uyumluluğu

	İnce tabaka kromatografisi	Bağlı yoğunluk	Kırılma indisi	Optik çevirme	Absorbans	Reçineleşmiş uçucu yağlar	Buharlaşmada kalıntı
Marka B	-	+	-	-	+	+	-
Marka C	+	+	-	-	-	+	-
Marka D	-	+	-	*	+	+	*
Marka F	-	+	-	-	-	+	-
Marka H	-	+	-	+	-	+	+
Marka I	-	+	+	+	+	+	+
Marka J	-	+	+	-	-	+	*
Marka K	+	-	-	-	-	+	*
Marka L	+	+	+	-	+	+	*
Marka M	-	+	-	-	-	+	*

\* Ölçüm için yeterli numune tedarik edilememiştir.

Analizi yapılan numunelerden 3 tanesinin buharlaşmada kalıntı yüzdeleri, farmakopede verilen sınır değerler olan %1.8-3.6 aralığının üzerinde bulunmuştur.

### Bergamot Uçucu Yağı Numunelerinin Analizi

Fransız Farmakopesi (1991)'de belirtilen özelliklere göre, bergamot uçucu yağının yeşil-sarı renkte olması gerekmektedir. Marka I numunesi renksiz olduğu için farmakopeye uygun bulunmamıştır. Farmakopede, İTK analizi için 2 farklı çözücü sistemi verilmiş olup, bunlardan birinde şahit çözücü linalol ve linalil asetat, diğerinde ise bergapten ve sitropten içermektedir. uygulaması sonucu elde edilen profilinde şahit çözücü olarak sitropten ve sitral kullanılmaktadır. Yapılan uygulama sonucunda; Marka M numunesinde linalol ve linalil asetata ait lekeler gözlenmezken, Marka B, J, M, N, O numunesinde sitropten ve sitrale ait lekeler gözlenmemiştir.

Optik çevirme derecesi için kabul edilebilir aralık, farmakopede (+16°)-(33°) olarak belirtilmiş olup; numunelerden 6 tanesinin ölçümü sonucu bulunan değerler bu aralığın dışında kalmıştır.

Farmakopeye göre kırılma indisi için verilen sınır değerler 1.464-1.468 iken, 6 numunenin kırılma indisinin bu aralığının dışında olduğu görülmüştür.

Numunelerin UV absorpsiyonlarının ölçüldüğü analizde; Marka D, N, I numunelerinin hesaplanan değerleri farmakopeye uygun bulunmazken, diğer numunelerden hesaplamaya uygun bir absorpsiyon spektrumu elde edilememiştir.

Marka B, I ve N numunelerinin buharlaşmada kalıntı tayini sonuçlarının, farmakopede verilen 4.2-6.5 aralığının dışında kaldığı tespit edilmiştir.

Çalışılan örnekler ile elde edilen değerlerin referans değerler ile uyumluluğu Tablo 7'de özetlenmiştir.

**Tablo 7.** Bergamot uçucu yağı numunelerinin analiz sonuçlarının referans değerler ile uyumluluğu

	İnce tabaka kromatografisi	Bağlı yoğunluk	Kırılma indeksi	Optik çevirme	Asitlik değeri	Absorbans	Buharlaşmada kalıntı
Marka B	-	+	+	-	+	-	-
Marka D	+	+	+	-	-	-	*
Marka I	+	+	-	+	-	-	-
Marka J	-	+	+	-	*	-	*
Marka K	+	+	-	-	*	-	*
Marka L	+	+	-	-	*	-	*
Marka M	-	+	-	+	*	-	*
Marka N	-	+	-	+	-	-	-
Marka O	-	+	-	-	*	-	*

\* Ölçüm için yeterli numune tedarik edilememiştir.

Bergamot ucuğu yağı, içeriğinde tespit edilen bileşikler ve miktarları çalışmada referans olarak kabul edilen Fransız Farmakopesi'nde (1991) verilen değerlerden büyük oranda sapma göstermektedir. Bu değerler Tablo 8'de verilmiştir.

**Tablo 8.** Bergamot uçucu yağı numunelerinin GC-MS analiz sonuçlarının referans değerler ile uyumluluğu

Bileşik	Numunede tespit edilen miktar (%)	Farmakopede verilen değer aralığı (%)
$\beta$ -Pinen	4.3	5.0-9.5
Limonen	73.7	33-42
$\delta$ -Terpinen	1.1	6.0-10.5
Linalol	1.3	7.0-15
Linalil asetat	0.9	22- 33
Geranial	1.0	0.5'ten az



### Fesleğen Uçucu Yağı Numunelerinin Analizi

Fesleğen uçucu yağı numunesinin linalol veya metil kavikol tipi olmasına göre spesifikasyonları değişmektedir. Numunenin farmasötik kullanıma uygun olması için linalol tip fesleğen uçucu yağ olması gerekmektedir, aksi taktirde kullanım sonucunda istenmeyen etkiler gözlenebilir. Linalol ve metil kavikol tip fesleğen uçucu yağlar için verilen değerler şu şekildedir; bağıl yoğunluk linalol tip için 0.891-0.924; metil kavikol tip için 0.946-0.983; kırılma indeksi linalol tipi için 1.4730-1.4900; metil kavikol tip için 1.5120-1.5220; optik çevirme linalol tipi için (-7.50)-(-14); metil kavikol tip için 0-(+1.5) olarak verilmiştir. Analizi yapılan numunelerin hiçbirinin, linalol tip fesleğen uçucu yağın spesifikasyonlarına sahip olmadığı tespit edilmiştir.

Çalışılan örnekler ile elde edilen değerlerin referans değerler ile uyumluluğu Tablo 9'da özetlenmiştir.

Numunesi temin edilen yağların farmakope analizi sonuçları, piyasadaki pek çok yağın farmakope kalitesinde olmadığını ortaya koymuştur.

**Tablo 9.** Fesleğen uçucu yağı numunelerinin analiz sonuçlarının referans değerler ile uyumluluğu

	Bağıl yoğunluk	Kırılma indeksi	Optik çevirme
<b>Marka B</b>	MK	-	-
<b>Marka D</b>	MK	MK	*
<b>Marka I</b>	MK	-	-
<b>Marka J</b>	MK	-	-
<b>Marka K</b>	+	-	-
<b>Marka P</b>	+	-	MK

\* Ölçüm için yeterli numune tedarik edilememiştir. MK: metil kavikol tip uçucu yağın spesifikasyonlarına uygun bulunmuştur.

Tüm analizler değerlendirildiğinde; çalışma kapsamında seçilen 7 çeşit uçucu yağ için 16 farklı markadan temin edilmiş uçucu yağ numunelerinden yalnızca 4 tanesi farmakopeye uygun bulunmuştur. Bu durum, son derece yüksek fiyatlara satılabilen ve halk arasında farmakolojik etkileri ile kullanılması mümkün olan uçucu yağlara dair suistimalin göz ardı edilemeyecek boyutta olduğunu göstermektedir. Son yıllarda uçucu yağ piyasasına artan talep, kimi durumlarda kaynak temini güç olan, genellikle düşük verimle elde edilen ve saklama koşullarından önemli derecede etkilendiği için taşınması gereken spesifikasyonları muhafaza etmesi zor olan bu ürünlerin maliyetinin düşürülmesi amacıyla, bu alandaki suistimallerin de artmasına neden olmuştur [11]. Bu bağlamda, uçucu yağların temininden güvenilir kaynakların tercih edilmesi büyük önem arz etmektedir.

### TEŞEKKÜR

Yazarlar GC-MS analizlerinin yürütüldüğü Anadolu Üniversitesi, Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (AÜBİBAM)'ne teşekkürlerini sunarlar.

Bu çalışma, 2190303 kodlu proje ile TÜBİTAK 1512 Girişimcilik Destek Programı (BİGG) kapsamında desteklenmiştir.

### YAZAR KATKILARI

Kavram: G.S.İ.; Tasarım: M.K., K.İ.Ö., G.S.İ.; Denetim: B.E., G.S.İ.; Kaynaklar: D.H., M.K., K.İ.Ö.; Malzemeler: B.E., M.K., K.İ.Ö.; Veri Toplama ve/veya İşleme: B.E., D.H., M.K., K.İ.Ö.; Analiz ve/veya Yorumlama: B.E., D.H.; Literatür Taraması: B.E., M.K., K.İ.Ö.; Makalenin Yazılması: B.E.; Kritik İnceleme: M.K., G.S.İ.; Diğer: B.E., M.K., K.İ.Ö.

### ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

## ETİK KURUL ONAYI

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

## KAYNAKLAR

1. Ali, B., Al-Wabel, N.A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S.A., Anwar, F. (2015). Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(8), 601-611. [\[CrossRef\]](#)
2. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253. [\[CrossRef\]](#)
3. Natrajan, D., Srinivasan, S., Sundar, K., Ravindran, A. (2015). Formulation of essential oil-loaded chitosan–alginate nanocapsules. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(3), 560-568. [\[CrossRef\]](#)
4. Bowles, E.J. (2003). *Chemistry of aromatherapeutic oils*, Crowns Nest NSW, Australia: Allen & Unwin.
5. Filiptsova, O.V., Gazzavi-Rogozina, L.V., Timoshyna, I.A., Naboka, O.I., Dyomina, Y.V., Ochkur A.V. (2018). The effect of the essential oils of lavender and rosemary on the human short-term memory. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(1), 41-44. [\[CrossRef\]](#)
6. Sowndhararajan, K., Kim, S. (2016). Influence of fragrances on human psychophysiological activity: with special reference to human electroencephalographic response. *Scientia Pharmaceutica*, 84, 724-751. [\[CrossRef\]](#)
7. Diego, M.A., Jones, N.A., Field, T., Hernandez-Reif, M., Schanberg, S., Kuhn, C., McAdam, V., Galamaga, R., Galamaga, M. (1998). Aromatherapy positively affects mood, EEG patterns of alertness and math computations. *International Journal of Neuroscience*, 96(3,4), 217-224. [\[CrossRef\]](#)
8. Freeman, M., Ayers, C., Peterson, C., Kansagara, D. (2019). Aromatherapy and essential oils: A map of the evidence. Department of Veterans Affairs (US), VA Evidence-based Synthesis Program Reports, Washington (DC).
9. Valussi, M., Donelli, D., Firenzuoli, F., Antonelli, M. (2021). Bergamot oil: Botany, production, pharmacology. *Encyclopedia*, 1(1), 152-176.
10. Onbaşı, D., Dal, A. (2020). Türk Farmakopesindeki tıbbi bitkilerinin incelenmesi. *ERÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 7(1), 22-36.
11. Do, T.K.T., Hadji-Minaglou, F., Antoniotti, S., Fernandez, X. (2015). Authenticity of essential oils. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 66, 146-157. [\[CrossRef\]](#)
12. Türk Farmakopesi 2017 (2018). Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı Yayınları.
13. Pharmacopée Française 1991. Huile essentielle de Bergamote Bergamotae aetheroleum.
14. Association Française de Normalisation (AFNOR). Essential oils direct Ltd. material safety data sheet: Basil oil sweet linalool. Revision Date: 05/02/2016.
15. Price, S., Price, L. (Eds.). (2011). *Aromatherapy for health professionals e-book*. Elsevier Health Sciences, p.38.



# CHEMICAL COMPOSITION AND *IN VITRO* ANALYSIS OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *ACUTODESMUS DIMORPHUS* (TURPIN) P.M. TSARENKO (SCENEDESMACEAE, CHLOROPHYTA)

*ACUTODESMUS DIMORPHUS* (TURPIN) P.M. TSARENKO (SCENEDESMACEAE,  
CHLOROPHYTA)' NİN KİMYASAL BİLEŞİMİ VE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİNİN  
*İN VİTRO* ANALİZİ

Eldrin DLR. ARGUELLES<sup>1\*</sup>

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

## ABSTRACT

**Objective:** Green microalgae are fast growing organisms and are known to have diverse bioactive compounds and biomolecules. The chemical composition and antibacterial activities of a green microalga, *Acutodesmus dimorphus* BIOTECH 4039 were studied.

**Material and Method:** Dried algal biomass of *A. dimorphus* was subjected to proximate and elemental composition analysis. Methanolic extract of *A. dimorphus* was used to determine the total phenolic content (TPC) and antibacterial activity of the microalga. TPC was measured using the Folin–Ciocalteu method. On the other hand, the antibacterial activity against medically important bacterial pathogens (*Staphylococcus epidermidis* BIOTECH 10098, penicillin acylase-producing *Bacillus cereus* BIOTECH 1509, *Listeria monocytogenes* BIOTECH 1958, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* BIOTECH 10378, *Pseudomonas aeruginosa* BIOTECH 1824, penicillin acylase-producing *Escherichia coli* BIOTECH 1634, and *Serratia marcescens* BIOTECH 1748) was done using modified Kirby-Bauer diffusion method.

**Result and Discussion:** *A. dimorphus* contained high amounts of protein, ash, and lipid with percent composition of  $43.19 \pm 0.13$ ,  $26.92 \pm 0.01$ , and  $14.17 \pm 0.04$ , respectively. The elemental nutrient composition of the algal biomass was observed to be in a decreasing order of  $Ca > Mg > K > Mn > Na > Fe > Zn > Pb > Cu > Cd > Cr$ . In addition, *A. dimorphus* has a TPC of  $5.34 \pm 0.09$  mg GAE/g. Potent antibacterial activities of *A. dimorphus* extract were observed against Methicillin-

\* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Eldrin DLR. Arguelles  
e-mail / e-posta: edarguelles@up.edu.ph, Phone / Tel.: +63495362721

*Resistant Staphylococcus aureus, S. epidermidis, penicillin acylase-producing Bacillus cereus with zones of inhibition of 15.1 ± 0.3 mm, 13.5 ± 0.1 mm, and 6.82 ± 0.7 mm, respectively. The study shows the use of A. dimorphus as good alternative source of important compounds and microelements that can be use in industrial and pharmaceutical application.*

**Keywords:** Antibacterial activity, chemical composition, microalgae, Philippines

## ÖZ

**Amaç:** Yeşil mikroalgler hızlı büyüyen organizmalardır ve çeşitli biyoaktif bileşiklere ve biyomoleküllere sahip oldukları bilinmektedir. Yeşil bir mikroalg olan *Acutodesmus dimorphus* BIOTECH 4039'un kimyasal bileşimi ve antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir.

**Gereç ve Yöntem:** *A. dimorphus*'un kurutulmuş alg biyokütlesi proksimate ve elemental kompozisyon analizine tabi tutulmuştur. *A. dimorphus*'un metanolik ekstresi, mikroalglerin toplam fenolik içeriğini (TPC) ve antibakteriyel aktivitesini belirlemek için kullanılmıştır. TPC, Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Öte yandan, tıbbi açıdan önemli bakteriyel patojenlere (*Staphylococcus epidermidis* BIOTECH 10098, penisilin asilaz üreten *Bacillus cereus* BIOTECH 1509, *Listeria monocytogenes* BIOTECH 1958) karşı antibakteriyel aktivite, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* BIOTECH 10378, *Pseudomonas aeruginosa* BIOTECH 1824, penicillin acylase-producing *Escherichia coli* BIOTECH 1634 ve *Serratia marcescens* BIOTECH 1748) modifiye Kirby-Bauer difüzyon yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

**Sonuç ve Tartışma:** *A. dimorphus*, sırasıyla 43.19 ± 0.13, 26.92 ± 0.01 ve 14.17 ± 0.04 yüzde bileşimiyle yüksek miktarda protein, kül ve lipid içermektedir. Alg biyokütlesinin elementel besin bileşiminin azalan bir sırayla Ca > Mg > K > Mn > Na > Fe > Zn > Pb > Cu > Cd > Cr olduğu görülmüştür. Ayrıca, *A. dimorphus* 5.34 ± 0.09 mg GAE/g TPC değerine sahiptir. *A. dimorphus* ekstraktının *Metisiline Dirençli Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, penisilin asilaz üreten *Bacillus cereus*'a karşı sırasıyla 15.1 ± 0.3 mm, 13.5 ± 0.1 mm ve 6.82 ± 0.7 mm inhibisyon zonları ile güçlü antibakteriyel aktiviteleri gözlenmiştir. Bu çalışma, *A. dimorphus*'un endüstriyel ve farmasötik uygulamalarda kullanılabilecek önemli bileşikler ve mikro elementler için iyi bir alternatif kaynak olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Antibakteriyel aktivite, Filipinler, kimyasal bileşim, mikroalg

## INTRODUCTION

Green microalgae are named for their grass-green chloroplasts with cell walls that are mostly cellulosic and may exist in several forms such as unicellular, filamentous, colonial and sheet-like. These microalgae are fast growing and are known to have diverse bioactive compounds and macromolecules that are yet to be discovered for biotechnological use, and the characterization as well as isolation of microalgae with the potent bioactive compounds remain the focus of continuing research [1,2]. The capability of several microalgal strains to survive and thrive in extreme environmental stresses results in the formation of a variety of secondary bioactive metabolites, important in agriculture and food industries [1,3]. These active metabolites are produced by these algae to maintain cell signaling pathways and constant intracellular membrane functions in response to sudden environmental changes.

Microalgal biomass together with algae-derived compounds has a vast potential use, from aquaculture and animal feed formulation to nutritional products for human application. Bioactive substances such as fatty acids, carotenoids, phycobilin, vitamins, polysaccharides, and sterols, are found in microalgal biomass [4-6]. Previous studies documented the successful production of several bioactive compounds from a number of economically-important microalgal species, including  $\beta$ -carotene and other carotenoids in *Dunaliella salina*; lutein in *Muriellopsis* sp.; zeaxanthin and lutein in *Scenedesmus almeriensis*; polyphenolic compounds and chlorophyll in *Synechocystis* sp.; lutein and astaxanthin in *Chlorella zofingiensis*; carotenoids and astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and *Chlorococcum* sp.; carotenoids in *Nanochloropsis oculata*; and bioactive peptide in green microalga, *Chlorella ellipsoidea* [4-6]. Bioactive metabolites aid microalgal cells in their ecological interactions with their environment, including cell to cell signaling and protection against competitors and predators [1,4]. Metabolites such as phenolics, fatty acids, glycolipids, diketone, terpenes, and alkaloids derived from green microalgae are reported to exhibit antibacterial activities [1,4,8]. These metabolites have been a valuable renewable

source in the development of novel pharmaceuticals, such as anti-cancer, antibiotic, and anti-inflammatory drugs. Microalgae serve as a reliable and good source of bioactive products since it is possible to cultivate these organisms in large scale using bioreactors and isolation of the target bioactive compounds are quite easy as compared to land plants. In addition, growth can be controlled (using culture media) so that the harvested algal biomass does not contain harmful substances such as pesticides and herbicides [6-8].

*Acutodesmus dimorphus* is a freshwater green microalga characterized by having uninucleated and spindle-shaped cells that forms a coenobia with linear chain of cells (2-4 cells). Previous studies documented that this microalga could produce bioactive compounds (such as gibberillins, cytokinins and auxins) which can be harnessed as biostimulants in biofertilizer formulation [3]. In addition, chemical composition of species belonging to the genera *Acutodesmus* were documented to possess high concentration of protein (about 30-40%) in their dried biomass showing the potential of these microalgae as alternative source of single cell proteins for food and feed application [3,5,6]. However, studies on the antibacterial activities of *A. dimorphus* are non-existent, particularly regarding the correlation of chemical constituents of the extract and its antimicrobial properties. Thus, it is necessary to search for novel sources of bioactive compounds from *A. dimorphus* as well as other green microalgae and assess their biological activities [6-8]. This study was done to assess the chemical composition and evaluate the antibacterial (using Kirby-Bauer inhibition assay) activity of a freshwater green microalgae, *A. dimorphus*.

## MATERIAL AND METHOD

### Microalgal Culture and Mass Production

The green microalga, *A. dimorphus* BIOTECH 4039 was obtained from a culture collection from the University of the Philippines Los Baños at PNCM-BIOTECH. Initially, 100 ml of *A. dimorphus* culture was transferred into three 1 L borosilicate flasks with BG 11 culture medium [9]. The components as well as the media were all sterilized at 15 psi for 15 min. Mass production of *A. dimorphus* was done for 16 days under 12:12 light condition (light intensity of white lamps is  $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) and kept at  $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . The culture set up was bubbled continuously with filtered air from an air pump with a superficial gas velocity of  $300 \text{ ml min}^{-1}$ . The biomass was collected via centrifugation for 10 min at a speed set at 10,000 rpm. The algal pellet was freeze-dried using a lyophilizer (Virtis Freeze mobile 25 SL) to obtain dried biomass [9].

### Preparation of Microalgal Extract

The algal extract was prepared by subjecting 1 gram of freeze-dried biomass of *A. dimorphus* in 20 ml methanol (continuous stirring for 1 hr) placed in an ultrasonic bath for 30 minutes. The reaction mixture was centrifuged for 20 min at a speed of 12,000 rpm at room temperature. The crude algal extract was further concentrated via a rotary evaporator under reduced pressure set at  $40^\circ\text{C}$  and was kept under refrigerated condition ( $4^\circ\text{C}$ ) before use in the biological assays done in the study [8,9].

### Proximate Composition Analysis

#### Moisture Content

About 3 grams of well mixed *A. dimorphus* biomass was weighed in tared evaporating dish. The alga was placed in an oven, set at  $105^\circ\text{C}$  for at least 5 hours. It was then placed in a desiccator, allowed to cool to room temperature, and weighed. The sample was returned to the oven for another 30 min, cooled, and reweighed. The procedure was repeated until consecutive weighing does not differ by more than 0.001 gram [2,7].

#### Ash Content

The *A. dimorphus* biomass was ignited in a muffled furnace at  $550^\circ\text{C}$  for 2 hours. It was then cooled to  $50^\circ\text{C}$  before placing in a desiccator. The sample was cooled to room temperature and weighed;

re-ignited repeatedly for 30 minute intervals until there was no more loss in weight [9,10]. The ash was calculated as follows:

$$\text{Ash Content (\%)} = \left( \frac{\text{Weight}_{\text{ash}}}{\text{Weight}_{\text{sample}}} \right) \times 100$$

### Fat Content (Soxhlet Method)

About one gram of *A. dimorphus* biomass was weighed in a thimble made of filter paper and dried in an oven for 2 hours. The treated *A. dimorphus* biomass was transferred in the extractor (using tared Soxhlet flask) and extracted using ether for 16 hours. After extraction, the sample was removed and the solvent recovered. The Soxhlet flask containing the lipid was dried in a hot plate for 5 min or until the solvent were removed, then cooled and weighed [7,9,10]. Crude fat was calculated as follows:

$$\text{Lipid Content (\%)} = \left( \frac{\text{Weight}_{\text{lipid}}}{\text{Weight}_{\text{sample}}} \right) \times 100$$

### Crude Fiber Content (Weende Method)

About 0.3 gram of fat-free *A. dimorphus* biomass was weighed using a 500 ml Erlenmeyer Flask and 200 ml of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (boiling condition) was added in the container. The flask was attached to a condenser and heated for exactly for 30 min. The flask was rotated frequently to ensure that the materials on the sides of the flask are in contact with the solution. After 30 min, the mixture was immediately filtered using a linen cloth in a stemless funnel and immediately washed with hot distilled water until washings are no longer acid. The residue in cloth was washed back to Erlenmeyer flask using boiling 200 ml NaOH. The flask is attached to a condenser and boiled again for 30 min. The residue was immediately filtered thru cloth in a funnel, washed with sterile distilled water, and transferred quantitatively back to flask. The residue was filtered through gouch crucible prepared with a thin layer of asbestos. The crucible and contents were dried at 110°C to constant weight and ignited at 600°C until carbonaceous matter has been consumed. The loss in weight was reported as crude fiber [7,9,10].

### Crude Protein (Kjeldahl) Method

Protein content was obtained by analysis of total nitrogen using the conventional Kjeldahl method and multiplying the amount of total nitrogen by a specific protein factor suitable for the sample. Protein was expressed in g per 100 g edible portion [7,9,10].

### Carbohydrate or Nitrogen Free extract Content

Carbohydrate content was calculated by subtracting the sum of crude fat, moisture, ash, crude fiber and crude protein from 100. Zero value was assigned to carbohydrates if the sum of water, protein, fat and ash is more than 100 [7,9,10].

$$\% \text{Carbohydrate} = 100 - (\% \text{Moisture Content} + \% \text{Protein} + \% \text{Fat} + \% \text{Ash})$$

### Elemental Composition Analysis

The biomass of *A. dimorphus* was treated to dry ashing using the standard Association of Official Analytical Chemists (AOAC) methods [7,10]. Initially, 1 g of *A. dimorphus* biomass was placed in a crucible and dried at 550°C for 5 h using a muffle furnace. The drying method was repeated until a grayish or white residue was observed and the difference in the weight of the sample is less than 0.05%. The residue was dissolved in 10 ml of concentrated HCl (1:1 ratio) and by heating slowly the reaction mixture. The solution was shortly placed to heat (hot plate with a temperature of 100°C) to dissolve further the remaining ash. The collected solution was cooled and filtered (using a Whatman filter paper) and transferred in a flask. Quantification and detection of sodium, calcium, magnesium, manganese,

zinc, potassium, chromium, cadmium, iron, lead, and copper using an atomic absorption spectrophotometer Perkin Elmer AAnalyst 400 [7].

### Determination of Total Phenolic Content (TPC)

The TPC of *A. dimorphus* was estimated using the methods done by Nuñez-Selles et al. [11]. Briefly, about 0.5 ml of *A. dimorphus* crude extract was added with 0.5 ml of Folin-Ciocalteu's reagent and 0.5 ml 10% sodium carbonate solution for one minute. The mixture was kept for 5 min at normal room temperature. The volume of the reaction mixture was adjusted to 5 ml using sterile distilled water. Optical density (absorbance reading) of the reaction mixture was measured using an Ultraviolet-Visible spectrophotometer at a wavelength of 720 nm. The TPC was given as milligram of gallic acid equivalent (GAE) per gram (calibration curve equation:  $y = 0.06415x - 0.0140$ ,  $R^2 = 0.9978$ ) [2,11].

### Antibacterial Activity

*A. dimorphus* crude extract was tested against four Gram-positive bacteria (*Staphylococcus epidermidis* BIOTECH 10098, penicillin acylase-producing *Bacillus cereus* BIOTECH 1509, *Listeria monocytogenes* BIOTECH 1958, and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) BIOTECH 10378) and three Gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* BIOTECH 1824, penicillin acylase-producing *Escherichia coli* BIOTECH 1634, and *Serratia marcescens* BIOTECH 1748) using cylinder cup assay (Modified Kirby-Bauer Method). All bacteria were pre-cultured using Luria Bertani (LB) broth medium and incubated for 24 hours at 37°C under shaking condition. The viability and purity of each bacteria were regularly monitored by doing regular morphological characterization and biochemical tests (Gram staining, coagulase test, starch hydrolysis test, oxidase test, methyl red/ Voges-Proskauer (MRVP) test, citrate utilization test, nitrate and urease test) [2,7,9].

Cylinder cup assay (Modified Kirby-Bauer diffusion method) was used to check the antimicrobial activity of the algal extract [2,9,12]. Initially, 10 ml of sterile Mueller-Hilton agar was placed in sterile plates and allowed to solidify. Five milliliters of top agar with 0.5 ml of bacterial inoculum (cell density of  $1 \times 10^6$  cells/ml) was then added. Bacterial density used in top agar was adjusted to equal turbidity of 0.5 McFarlands. Four cylinder cups were placed on the agar surface. Two cylinder cups were filled with 0.1 ml of *A. dimorphus* extract while the other two cups were each filled with 0.1 ml of sterile distilled water (negative control) and 0.1 ml 1000 ppm tetracycline (positive control). Each plate was then incubated at 35°C for 24 hours [2,9,12]. After the incubation period, zones of inhibition were measured for *A. dimorphus* extract as well as the standard antibiotic and are expressed as activity percentage. Antibacterial activity of *A. dimorphus* extract was classified as weak (inhibition zone < 50%), moderate (inhibition zone 50-70%), or strong (inhibition zone  $\geq 70\%$ ) [12].

$$\text{Antibacterial Activity (\%)} = \frac{A}{B} \times 100$$

Where: A = clear zone of *A. dimorphus* extract (mm) and B = clear zone of antibiotic (mm)

### Statistical Analyses

The data from the different assays and analysis are given as means  $\pm$  standard deviations of three experimental replicates and was computed using MS Office Excel 2019.

## RESULT AND DISCUSSION

### Proximate Composition Analysis

Proximate composition is a method used to quantitatively quantify the nutritional component of a sample. The method is composed of determining ash, moisture, crude protein, crude fiber, and crude fat. Even though proximate analysis does not provide a complete nutritional assay, the method is easy to conduct and is considered as an inexpensive assay to assess the nutritional quality of a sample. Thus, determining the chemical composition of microalgae will provide valuable information on the potential of a sample (eg. algal biomass) for food and industrial application [13].

The biomass of *Acutodesmus dimorphus* BIOTECH 4039 contained high amounts of protein, ash, and crude fat (lipid) with percent composition of  $43.19 \pm 0.13$ ,  $26.92 \pm 0.01$ , and  $14.17 \pm 0.04$ , respectively (Table 1). The result observed in this study is similar to earlier studies documenting that proximate composition of different green microalgal strains reported protein as the most copious biomolecule of the alga making up to 70% of the overall dry weight biomass [14,15,16]. High concentration of protein was observed in *A. dimorphus* biomass showing the potential of this alga as alternative source of single cell proteins for food and feed application. Protein is typically the major biochemical composition of microalgae that is affected by growth medium and growth stage as what was observed in this study. Rapidly growing microalgal cells (cells that are in exponential phase of their life cycle) contains high amounts of protein as well as low carbohydrate content. However, when cells enters the stationary phase, majority of the carbon (in the algal cell) is being used to generate lipids [17]. The ash content of *A. dimorphus* was greater than those documented for *Phaeodactylum tricorutum* (17.0%), *Nannochloropsis granulata* (6.70%), *Scenedesmus quadricauda* (25.77%), and *Neochloris oleoabundans* (16.70%) [9, 15]. The ash content of *A. dimorphus* shows that high mineral content is present in the algal biomass. Crude fat includes true fats and various lipid substances such as fatty acids, lecithin and pigments extracted from microalgae by Soxhlet method using ether as solvent [10]. In this study, crude fat content of *A. dimorphus* is higher as compared to those observed by Tibbets [15] from *Tetraselmis chuii* (12.3%) and *Porphyridium aerugineum* (13.7%) grown in photobioreactors. Variation in the amount of cellular lipid are correlated to algal growth stage. Overall, total fatty acids increase with late algal growth stage (especially at stationary phase of growth where lipid accumulation in algal cells is observed). And also, under stressful conditions several strains of microalga change their biosynthetic pathways in generation of neutral lipids (about 20–50% dry cell weight), mostly in the form of triacylglycerol, allowing microalgae to tolerate unfavorable growth conditions [18]. The current study also showed that dominant components of *A. dimorphus* biomass aside from ash, protein and lipids were moisture ( $4.15 \pm 0.11\%$ ), carbohydrates ( $6.45 \pm 0.02\%$ ), and crude fiber ( $5.12 \pm 0.17\%$ ). The chemical composition of *A. dimorphus* differs when compared to other microalgal species [2,9]. Differences on the proximate composition of microalgae may be due to variations in culture growth condition, by which these microalgae are signaled to stimulate or inhibit the metabolic formation of several important biochemical components.

**Table 1.** Proximate analysis composition of *Acutodesmus dimorphus*.

Proximate composition	Percent composition (%)
Ash Content	$26.92 \pm 0.01$
Moisture Content	$4.15 \pm 0.11$
Carbohydrate	$6.45 \pm 0.02$
Crude Fiber	$5.12 \pm 0.17$
Crude Fat	$14.17 \pm 0.04$
Crude Protein	$43.19 \pm 0.13$

### Elemental Composition Analysis

Assessment of minerals present in algal biomass shows important information of the nutrient composition of the alga. Ash is simply the total mineral content of the microalgal sample. Naturally, ash from combustion of algal biomass is composed of high concentration of elemental nutrients, such as calcium (Ca), phosphorus (P), potassium (K), magnesium (Mg), and sodium (Na), as well as heavy metals. Among other heavy metals (mineral elements), chromium (Cr), zinc (Zn) arsenic (As), manganese (Mn), copper (Cu), cobalt (Co), nickel (Ni), and molybdenum (Mo) are the trace and minor elements that exists at varying concentrations in microalgae biomass [13].

The average concentration of each mineral components in *A. dimorphus* is presented in Table 2. The elemental composition and distribution in *A. dimorphus* biomass were noted to be in a decreasing order of  $Ca > Mg > K > Mn > Na > Fe > Zn > Pb > Cu > Cd > Cr$ . *Acutodesmus dimorphus* has high



amounts of minerals (calcium, magnesium, potassium, and manganese), like those documented for *Scenedesmus* sp., *Navicula* sp., *Oscillatoria* sp., *Spirulina* sp., and *Scenedesmus quadricauda* [9,14]. Calcium ( $10,271.11 \pm 9.01$  ppm) is the dominant microelement in *A. dimorphus* biomass, followed by magnesium ( $9,934.32 \pm 121$  ppm), potassium ( $7,103 \pm 0.61$  ppm), and manganese ( $9,870.42 \pm 1.03$  ppm). This observation may be due to the influence of the concentration of inorganic compounds and salts presents in the culture medium where the algae grow. Microelements such as copper, zinc, iron, cadmium, and lead are also present in *A. dimorphus* biomass which is below the toxicity limits. Thus, confirming the potential application of this microalgae as good source of important microelements that can be use in industrial and pharmaceutical application. Other important micro-elements like calcium, iron, and potassium were also observed in high amounts showing the potential use of *A. dimorphus* as additives to improve food quality needed to address malnutrition that is timely and relevant to several countries in the world [1,2,14].

**Table 2.** Concentrations and composition of micro and macro-elements of *Acutodesmus dimorphus*.

Microalga	Elemental Parameter* (in ppm)										
	Ca	Mg	Na	Mn	K	Fe	Zn	Cu	Pb	Cr	Cd
<i>Acutodesmus dimorphus</i>	10,271.11 $\pm$ 9.01	9,924.32 $\pm$ 121	3,197 $\pm$ 102	9,870.42 $\pm$ 1.03	7,103 $\pm$ 0.61	398.44 $\pm$ 1.94	3.15 $\pm$ 0.31	1.16 $\pm$ 0.01	1.32 $\pm$ 0.13	0.89 $\pm$ 0.05	0.97 $\pm$ 0.03

\* All experimental datas are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n = 3)

### Total Phenolic Content

Phenolic compounds (such as gallic acids, kaempferol, and quercetin) are group of chemical substances commonly found in several microalgal species. These metabolites are known for its bioactive properties such as antimicrobial, cytotoxicity and antioxidant properties which can be used as unique sources of bioactive ingredient for generation and synthesis of new drugs [1,20]. The total phenolic content (TPC) of *A. dimorphus* is  $5.34 \pm 0.09$  mg GAE/g extract. It is greater than those previously reported phenolic contents of microalgae such as *Botryococcus braunii*, *Chaetoceros calcitrans*, *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Nannochloropsis ornata*, *Neochloris oleoabundans*, *Parachlorella kessleri*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Porphyridium cruentum*, *Tetraselmis suecica*, and *Scenedesmus obliquus* with TPC of  $1.99 \pm 0.17$ ,  $1.84 \pm 0.11$ ,  $1.47 \pm 0.16$ ,  $1.23 \pm 0.06$ ,  $2.04 \pm 0.35$ ,  $3.73 \pm 0.24$ ,  $1.38 \pm 0.16$ ,  $3.75 \pm 0.46$ ,  $1.71 \pm 0.57$ , and  $1.94 \pm 0.16$  mg GAE/g, respectively [19]. However, Safafar et. al. [20] showed that biomass of *Desmodesmus* sp., *Nannochloropsis salina*, *Nannochloropsis limnetica*, and *Chlorella sorokiniana* have higher TPC than *A. dimorphus*, which are  $7.72 \pm 0.08$ ,  $6.45 \pm 0.25$ ,  $5.78 \pm 0.12$ , and  $5.86 \pm 0.06$  mg GAE/g, respectively. Variations in the TPC values among different species of microalgae is dependent on several factors such as solvent type, polarity of extractant (solvent), and solubility of algal phenolic compounds [11,12].

### Antibacterial Activity

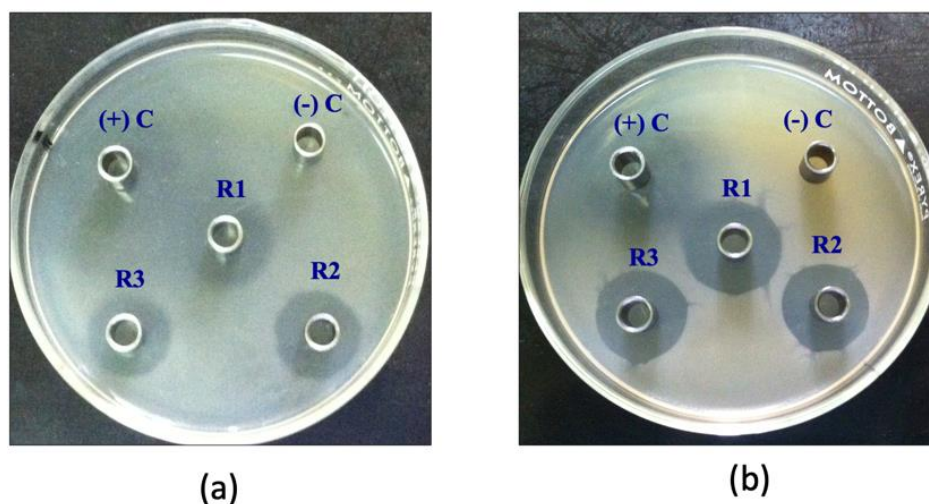
Microalgae are novel sources of secondary metabolites for pharmaceutical application. Bioactive metabolites produced by different strains of green microalgae include carotenoids, phenolic compounds, alkaloids, terpenes, fatty acids, and other small bioactive metabolites [21]. These intracellular and extracellular metabolites can serve as bioactive substances which are reported to have anticancer, antibacterial, antioxidant, and antiviral properties [21,22,23]. *A. dimorphus* exhibited antibacterial activities against *S. epidermidis*, penicillin acylase-producing *B. cereus*, and Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). Potent antibacterial activities of *A. dimorphus* extract were observed against MRSA and *S. epidermidis* with zones of inhibition of  $15.1 \pm 0.3$  mm and  $13.5 \pm 0.1$  mm, respectively (Table 3 and Figure 1). On the other hand, *A. dimorphus* extract showed a weak antibacterial activity against penicillin acylase-producing *Bacillus cereus* with zone of inhibition of  $6.82 \pm 0.7$  mm. The findings of this investigation are comparable to that observed by Alsenani et. al. [24] wherein methanol and ethanol extracts of *Isochrysis galbana* and *Chlorella* sp. showed antibacterial activities against *Staphylococcus*

*aureus* and *S. epidermidis* with zones of inhibition of  $16.67 \pm 0.58$  mm and  $18.33 \pm 0.55$  mm, respectively. In addition, Smith et al. [25,26] reported that fatty acids (palmitoleic acid eicosapentaenoic acid (EPA), and hexadecatrienoic acid) from *Phaeodactylum tricornutum* showed antagonistic activity towards MRSA [26]. The potent antibacterial properties of *A. dimorphus* extract against bacterial pathogens may also be due to metabolites such as phenolic compounds, alkaloids, gallic acids, and terpenoids that are present in microalgal cells [26,27,28]. To the best of our knowledge, this study is the first to report the antibacterial activities of *A. dimorphus* against *S. epidermidis*, penicillin acylase-producing *Bacillus cereus*, and MRSA.

**Table 3.** Antibacterial activities of *Acutodesmus dimorphus* extract.

Sample	Antibacterial Activity <sup>a</sup>						
	Gram-positive bacteria				Gram-negative bacteria		
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> BIOTECH 10098	Penicillin acylase-producing <i>Bacillus cereus</i> BIOTECH 1509	<i>Listeria monocytogenes</i> BIOTECH 1958	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> BIOTECH 10378	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BIOTECH 1824	Penicillin acylase-producing <i>Escherichia coli</i> BIOTECH 1634	<i>Serratia marcescens</i> BIOTECH 1748
<i>Acutodesmus dimorphus</i> BIOTECH 4039	13.5 ± 0.1 (79.88***)	6.82 ± 0.7 (33.43*)	-	15.1 ± 0.3 (88.30***)	-	-	-
Tetracycline <sup>b</sup>	16.9 ± 0.7	20.4 ± 0.2	15.8 ± 0.3	17.1 ± 0.4	19.7 ± 0.1	18.5 ± 0.2	15.7 ± 0.9

Note: <sup>a</sup>Antibacterial activity percentage (%) of algal extracts in contrast to tetracycline: inhibition zone (mm) of algal extract/inhibition zone (mm) of antibiotic (tetracycline): \*\*\* strong inhibition ( $\geq 70\%$ ), \*\*moderate inhibition (50-70%), and \*weak inhibition ( $< 50\%$ ) against bacterial pathogen. <sup>b</sup>positive control (antibiotic). (-) no zone of inhibition.



**Figure 1.** Zones of inhibition exhibited by *A. dimorphus* methanol extract against (a) *Staphylococcus epidermidis* and (b) Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* growth. (+C) tetracycline/positive control, (-C) methanol/negative control, (R1, R2, R3) replicates 1-3.

The study also documented that *A. dimorphus* methanol extract do not have antibacterial activities against *Pseudomonas aeruginosa*, penicillin acylase-producing *Escherichia coli*, and *Serratia marcescens* (Table 3). Generally, methanolic extract of *A. dimorphus* is considered more effective in inhibiting Gram-positive strains of bacteria than Gram-negative strains. Variations in the antagonistic activities of *A. dimorphus* extract may be due to cell wall differences among the groups of bacteria.

Gram-negative bacteria have multilayered cell walls that can serve as an additional protection against bioactive substances present in *A. dimorphus* extract [1,2,27,28,29]. Additional experimental research that will concentrate on the isolation and identification of the bioactive compounds is recommended. Also, an *in vivo* toxicity assays should be conducted to further prove the safety and effectivity of *A. dimorphus* extract for industrial application.

In conclusion, *Acutodesmus dimorphus* biomass is composed mainly of proteins, lipids, and ash. Also, high amounts of phenolic compounds as well as other important minerals such as calcium, magnesium, potassium, and manganese are present in *A. dimorphus* biomass. In addition, potent antibacterial activities against *Staphylococcus epidermidis*, Methicillin-resistant *S. aureus*, and penicillin acylase-producing *Bacillus cereus* were also exhibited by the algal extract. The results of this assay is the first report that documents the antibacterial activities of *Acutodesmus dimorphus* in opposition to these important bacterial pathogens. Thus, confirming the potential application of this microalgae as good alternative source of important compounds and microelements that can be use in industrial and pharmaceutical application.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The author is grateful for the financial and technical support given by the PNCM-BIOTECH, UPLB and Mrs. Arsenia B. Sapin for the conduct of the research study.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

## CONFLICT OF INTEREST

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

## ETHICS COMMITTEE APPROVAL

The author declares that the ethics committee approval is not required for this study.

## REFERENCES

1. Arguelles, E.D.L.R. (2022). Total phenolic content and in vitro analysis of antioxidant, antibacterial, and alpha-glucosidase inhibition properties of *Chroococcus minutus* (Kützing) Nägeli (Chroococcales, Cyanobacteria). Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi. 46(1), 170-181. [\[CrossRef\]](#)
2. Arguelles, E.D.L.R. (2021). Biochemical composition and bioactive properties of *Chlorella minutissima* (Chm1) as a potential source of chemical compounds for nutritional feed supplement and disease control in aquaculture. Current Applied Science and Technology, 21(1),65-77.
3. Garcia-Gonzalez,J.; Sommerfeld, M. (2016). Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. Journal of Applied Phycology. 28, 1051-1061. [\[CrossRef\]](#)
4. Choochote, W., Suklampoo, L., Ochaikul, D. 2014. Evaluation of antioxidant capacities of green microalgae. Journal of Applied Phycology, 26(1), 43-48. [\[CrossRef\]](#)
5. Martinez-Goss, M.R., Manlapas, J.E.B., Arguelles, E.D.L.R. (2019). Cyanobacteria and diatoms in the cyanobacterial mats in a natural saltwater hot spring in Coron, Palawan, Philippines. Philippine Science Letters, 12(Supplement), 11-32.
6. Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. Food Chemistry, 102, 771-776. [\[CrossRef\]](#)
7. Arguelles, E.D.L.R., Sapin, A.B. (2021). Chemical composition and bioactive properties of *Sargassum aquifolium* (Turner) C. Agardh and its potential for pharmaceutical application. Philippine Journal of Science, 151(S1), 9-24. [\[CrossRef\]](#)

8. Arguelles, E.D.L.R., Sapin, A.B. (2020). *In vitro* antioxidant, alpha-glucosidase inhibition, and antibacterial properties of *Turbinaria decurrens* Bory (Sargassaceae, Ochrophyta). *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 25(3), 1-9.
9. Arguelles, E.D.L.R. (2018). Proximate analysis, antibacterial activity, total phenolic content and antioxidant capacity of a green microalga *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, 20(1), 150-158.
10. AOAC (2011). *Official Methods of Analysis of AOAC*. 18<sup>th</sup> edition, Gaithersburg, MD.
11. Nuñez Selles, A., Castro, H.T.V., Agüero, J.A., González, J.G., Naddeo, F., De Simone, F., Pastrelli, L. (2002). Isolation and quantitative analysis of phenolic antioxidants, free sugars and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as a nutritional supplement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 762-766. [\[CrossRef\]](#)
12. Elfita, Mardiyanto, Fitriya, Eka Larasati, J., Julinar, Widjajanti, H., Muharni. (2019). Antibacterial activity of *Cordyline fruticosa* leaf extracts and its endophytic fungi extracts. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 20(12), 3804-3812. [\[CrossRef\]](#)
13. Bi, Z., He B.B. (2013). Characterization of microalgae for the purpose of biofuel production. *Transaction of the American Society of Agricultural and Biological Engineers*, 56(4), 1529-1539. [\[CrossRef\]](#)
14. Sivakumar, K., Senthilkumar, R. (2008). Biodiversity of microalgae and their elemental components from Veeranam Lake, Tamilnadu, India. *Korean Journal of Ecology and Environment*, 41(2), 128-136.
15. Tibbetts, S.M., Milley, J.E., Lall, S.P. (2015). Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 27, 1109-1119. [\[CrossRef\]](#)
16. Arguelles, E.D.L.R., Sapin, A.B. (2020). Bioprospecting of *Turbinaria orrnata* (Fucales, Phaeophyceae) for cosmetic application: Antioxidant, tyrosinase inhibition and antibacterial activities”, *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*, 26(2), 30-41.
17. Gatenby, C.M., Orcutt, D.M., Kreeger, D.A., Parker, B.C., Jones, V.A., Neves, R.J. (2003). Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels. *Journal of Applied Phycology*, 15, 1-11 [\[CrossRef\]](#)
18. Sharma, K.K., Schuhmann, H., Schenk, P.M. (2012). High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*, 5, 1532-1553. [\[CrossRef\]](#)
19. Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., De Cooman, L. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology*, 24, 1477-1486. [\[CrossRef\]](#)
20. Safafar, H., van Wageningen, J., Møller, P., Jacobsen, S. (2015). Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. *Marine Drugs*, 13, 7339-7356. [\[CrossRef\]](#)
21. Little, S.M., Senhorinho, G.N.A., Saleh, M., Basilikio, N., Scott, J.A. (2021). Antibacterial compounds in green microalgae from extreme environments: a review. *Algae*, 36(1), 61-72. [\[CrossRef\]](#)
22. Senhorinho, G.N.A., Laamanen, C.A., Scott, J.A. (2018). Bioprospecting freshwater microalgae for antibacterial activity from water bodies associated with abandoned mine sites. *Phycologia* 57, 432-439. [\[CrossRef\]](#)
23. Arguelles, E.D.L.R., Monsalud, R.G. (2017). Morphotaxonomy and diversity of terrestrial microalgae and cyanobacteria in biological crusts of soil from paddy fields of Los Baños, Laguna (Philippines). *Philippine Journal of Systematic Biology*, 11(2), 25-36.
24. Alsenani, F., Tupally, K.R., Chua, E.T., Eltanahy, E., Alsufyani, H., Parekh, H.S., Schenk, P.M. (2020). Evaluation of microalgae and cyanobacteria as potential sources of antimicrobial compounds. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28, 1834-1841. [\[CrossRef\]](#)
25. Benkendorff, K., Davis, A.R., Rogers, C.N., Bremner, J.B. (2005). Free fatty acids and sterols in the benthic spawn of aquatic molluscs, and their associated antimicrobial properties. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 316(1), 29-44. [\[CrossRef\]](#)
26. Smith, V.J., Desbois, A.P., Dyrinda, E.A. (2010). Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. *Marine Drugs*, 8(4), 1213-1262. [\[CrossRef\]](#)
27. Arguelles, E.D.L.R., Sapin, A.B. (2022). Proximate composition and *in vitro* analysis of antioxidant and antibacterial activities of *Padina boryana* Thivy. *Science, Engineering and Health Studies*, 16, 22030002.
28. Arguelles, E.D.L.R., Sapin, A.B. (2022). Bioactive properties and therapeutic potential of *Padina australis* Hauck (Dictyotaceae, Ochrophyta). *International Journal of Agricultural Technology*, 18(1), 13-34.
29. Katircioglu, H., Beyalti, Y., Aslim, B., Yusekdag, Z., Atic, T. (2006). Screening for antimicrobial agent production of some microalgae in freshwater. *The Internet Journal of Microbiology*. 2(2),63-72. [\[CrossRef\]](#)



## EVALUATION OF THE POTENTIAL ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *BERBERIS CRATAEGINA* DC.: BY FOCUSING ON QUORUM SENSING INHIBITION OF *CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM* ATCC 12472

*BERBERIS CRATAEGINA* DC'NİN ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE POTANSİYELİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ: *CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM* ATCC 12472'DE ÇEVREYİ  
ALGILAMA SİSTEMİ İNHİBİSYONUNA ODAKLANARAK

Fatma Tuğçe GÜRAĞAÇ DERELİ<sup>1</sup> , Evren ARIN<sup>2</sup> , Ebru ÖNEM<sup>3\*</sup> 

<sup>1</sup>Süleyman Demirel University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 32260, Isparta,  
Türkiye

<sup>2</sup>Süleyman Demirel University, Vocational School of Health Services, Department of Anesthesia,  
32260, Isparta, Türkiye

<sup>3</sup>Süleyman Demirel University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology,  
32260, Isparta, Türkiye

### ABSTRACT

**Objective:** *In the present study described here, we set out to look into the quorum sensing inhibitory activity of the methanolic seed extract of Berberis crataegina DC. through quorum sensing - controlled inhibition of violacein pigment production in Chromobacterium violaceum ATCC 12472. In addition, the antibacterial activity of the extract on various Gram-negative and Gram-positive standard strains was evaluated. Also, phenolic contents in the extract were detected by using HPLC analysis.*

**Material and Method:** *“The phytochemical profile of the seed extract was performed by High-Performance Liquid Chromatography technique. Antibacterial activity assays were performed on the extract using the agar well method and inhibition of the violacein pigment production was investigated spectrophotometrically.*

\* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Ebru Önem  
**e-mail / e-posta:** ebruonem@sdu.edu.tr, **Phone / Tel.:** +902462110329

**Result and Discussion:** According to antibacterial activity results Gram-negative bacteria were more resistant than Gram-positive bacteria and violacein pigment production was inhibited by 66 % percentage. Phytochemical analysis results also showed that the major component in the extract is chlorogenic acid, with a value of 1974.91 µg/ml.

**Keywords:** Antibacterial, HPLC, phenolic content, quorum sensing

## ÖZ

**Amaç:** Burada açıklanan çalışmada, *Berberis crataegina* DC'nin metanolik tohum ekstresinin çevreyi-algılama sistemi üzerindeki inhibe edici aktivitesini *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472'de viyolasin pigment üretiminin çevreyi-algılama sistemi kontrollü inhibisyonu yoluyla araştırılması amaçlandı. Ek olarak, ekstrenin çeşitli Gram negatif/Gram pozitif standart suşlar üzerindeki antibakteriyel aktivitesi değerlendirildi. Ayrıca HPLC analizi ile ekstrenin fenolik içeriği tespit edildi.

**Gereç ve Yöntem:** Bitki ekstresinin fitokimyasal içeriği yüksek performanslı sıvı kromatografisi tekniği ile belirlenirken antibakteriyel aktivite agar kuyucuk yöntemi ile belirlenmiştir. Viyolasein pigment üretimi ise spektrofotometri yöntemi ile araştırılmıştır.

**Sonuç ve Tartışma:** Yapılan çalışmalar sonucunda antibakteriyel aktivite testinde Gram-pozitif bakterilerin Gram-negatif bakterilere göre bitki ekstresine daha duyarlı olduğu görüldükçe, ekstrenin viyolasein pigment üretimi üzerinde % 66 oranında bir inhibisyona sahip olduğu belirlenmiştir. Fitokimyasal içeriğin belirlendiği analiz zonucuna göre ise klorojenik asit 1974.91 µg/ml konsantrasyon değeri ile ekstredeki major bileşen olarak tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Antibakteriyel, çevreyi algılama, fenolik bileşen, HPLC

## INTRODUCTION

The misuse, abuse and over-use of antibiotics have resulted in severe resistance problems that constitute a grave threat to the health of humans [1]. Today, there is an urgent need to discover ways to solve the problem of antibiotic resistance, and natural resources have gained importance at this point. In research in this field, the evaluation of antibacterial and anti-quorum-sensing activities of medicinal herbs is becoming more popular day by day [2].

Quorum sensing (QS) is a mechanism for cell-to-cell signalling that can regulate the expression of genes responsible for the pathogenesis of microorganisms. Many medically important human pathogenic bacteria use this communication system for the conjugation, production of virulence factors, biofilm formation, motility, adherence and drug resistance [3]. QS was first described in the marine bacteria *Vibrio fischeri*. In 1970, Nealson et al. discovered that *V. fischeri* strains could communicate through secreting peptidic signalling molecules. This allowed bacteria to control bacterial behaviours in order to survive [4]. Since the QS mechanism has a key role in the pathogenesis of infectious disorders, it has been a target of interest in the research of novel anti-virulence agents [5].

In the present study described here, we aimed to investigate the QS inhibitory activity of the methanolic seed extract of *Berberis crataegina* DC. (BC) through QS-controlled inhibition of violacein pigment production in *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. In addition, the antibacterial effect of the extract on various Gram-positive and Gram-negative standard strains was evaluated.

## MATERIAL AND METHOD

### Plant Extraction Procedure

Seeds of BC were collected from Tufanbeyli/Adana on the date of August 30, 2021. The herbarium sample was authenticated by Assoc. Prof. İlker Çinbilgel and has been submitted to the Herbarium of Iğdir University Biodiversity Application and Research Center with voucher number INWM00000103. To prepare the methanolic extract, 5 g of powdered dried seeds were subjected to maceration with 50 ml of 95 % methanol. The extract was filtered through Whatman No. 1 filter paper, and the filtrate was evaporated to dryness at 36 °C using a rotary evaporator (Heidolph Hei-Vap Rotary Evaporator). At the end of the process, the crude extract remaining in the flask was weighed and the amount recorded, then dissolved with dimethyl sulfoxide (DMSO) and transferred to a vial.



## Phytochemical Screening

The phytochemical characterization of the seed extract was performed by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique. Conditions for HPLC analysis are presented in Table 1.

**Table 1.** Chromatographic conditions

Chromatographic conditions	Time (min.)	A (%)	B (%)
<b>Detector:</b> RF-10AXL Fluorescence Detector (Ex 295nm- Em 330 nm)	0	93	7
	20	72	28
<b>Autosampler:</b> SIL-20AC prominence	28	75	25
<b>System controller:</b> LC-20AT prominence	35	70	30
<b>Pump:</b> LC-20AT prominence	50	70	30
<b>Degasser:</b> DGU-14a	60	67	33
<b>Column heater:</b> CTO-10 A vp	62	58	42
<b>Column:</b> Gl Sciences Inertsil SIL 100A (250 mm × 4.6 mm), 5 µm	70	50	50
<b>Column temperature:</b> 25 °C	73	30	70
<b>Mobile phases:</b> A: Hexane, B: 2-propanol (98 :2)	75	20	80
<b>Flow rate:</b> 0.8 ml / min.	80	0	100
<b>Injection volume:</b> 10 µl	81	93	7

## Test Organisms

In order to evaluate the antibacterial effect of the plant extract, a total of 6 strains, 2 Gram-negative strains [*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1] and 4 Gram-positive strains [*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* ATCC 11778, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 43300] were included in the study. *C. violaceum* (ATCC 12472) strain was used to evaluate the inhibition of the violacein pigment production

## Screening Seed Extract for Antibacterial Activity

Antibacterial activity assays were performed on the extract using the agar well method. This is a semi-quantitative test method for indicating the capacity of antimicrobials to inhibit microorganisms' growth [6].

The bacteria strains used in the study were inoculated into Luria-Bertani Broth (LBB) medium and waited for 24 hours at 37°C in the incubator. The bacterial cultures were adjusted to 0.5 McFarland (10<sup>8</sup>/ml) turbidity standard and spread on Muller Hinton Agar plates. Six mm diameter wells were opened on the media and 100 µl of the plant extract was loaded into the wells. Gentamicin (40 µg/ml) was used as positive control. After overnight incubation at 35°C, by evaluating the zone sizes, antibacterial activity was discovered. The test was performed in triplicate.

## The Determination of the Inhibition of the Violacein Pigment Production

Violacein is a violet colour secondary metabolite produced by diverse microorganisms to protect from environmental stress factors [7]. The production of this indole derivative compound is mediated by QS and is essential for biofilm formation [8]. As a reference strain, *C. violaceum* ATCC 12472 has the ability to produce this pigment, and thus, it is widely preferred for QS inhibition studies [9].

In this research, the inhibitory effect of the seed extract on the QS-regulated violacein production in *C. violaceum* ATCC 12472 was investigated spectrophotometrically [10]. A hundred  $\mu\text{l}$  (60 mg/ml concentration) of the seed extract was added to 5 ml of LBB containing *C. violaceum* ATCC 12472 and incubated overnight in a shaker incubator at 30°C. At the end of the incubation, the bacterial culture was centrifuged at 14500 rpm for 10 minutes. After discarding the supernatant, 5 ml of DMSO was added and vortexed for 30 seconds. Centrifugation was performed at 14500 rpm for 10 minutes and the absorbance of the supernatant was read at 585 nm. LBB containing *C. violaceum* was used as a positive control. The percentage of violacein inhibition was quantified as follows:

$$\text{Percentage of violacein inhibition} = (\text{Control OD}_{585 \text{ nm}} - \text{Sample OD}_{585 \text{ nm}} / \text{Control OD}_{585 \text{ nm}}) \times 100$$

OD: Optical Density

## RESULT AND DISCUSSION

*BC*, also traditionally known as “Karamuk” in Turkey, is a medicinal shrub belonging to the Berberidaceae family [11]. It naturally grows in Europe and Asia. All parts of this plant are used in traditional medicine systems worldwide [12]. While there has been a plethora of report published that has described *BC* have antioxidant, anti-inflammatory, analgesic and febrifuge activities, little is known about its antimicrobial and anti-quorum sensing properties [13- 15]. In a study conducted by Kaya et al., chitosan-based edible films prepared from *BC* seed oil and fruit extract were found to have high antioxidant, anti-quorum sensing and antimicrobial activity [16].

We have investigated the antibacterial effect of the extract on various Gram-positive and Gram-negative standard strains.

Data on antibacterial screening are depicted in Table 2. Based on the results, the extract possesses a similar activity on Gram-positive bacteria, however, it is not active against Gram-negative bacteria at the studied concentration (60 mg/ml). Moreover, the extract showed antibacterial activity on Gram-positive bacteria, similar to the antibiotic gentamicin, which was chosen as the reference. The findings of this study support the possibility that *BC* could be used in the treatment of infections caused by selected Gram-positive bacteria.

**Table 2.** Results of the antibacterial agar well diffusion test (mm)

Sample	<i>E. faecalis</i> ATCC29212	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>MRSA</i> ATCC 43300	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>P.aeruginosa</i> PAO1	<i>E.coli</i> ATCC 25922
Methanolic seed extract of <i>BC</i>	17.0±0.0 ns	16.0±1.0 a**	17.7±1.2 a*	19.0±0.0 ns	ne	ne
CN (40 $\mu\text{g/ml}$ )	18.0±0.0	14.3±0.6 b	14,3±0.6 b	19.3±0.6	15.7±0.6	13.3±0.6

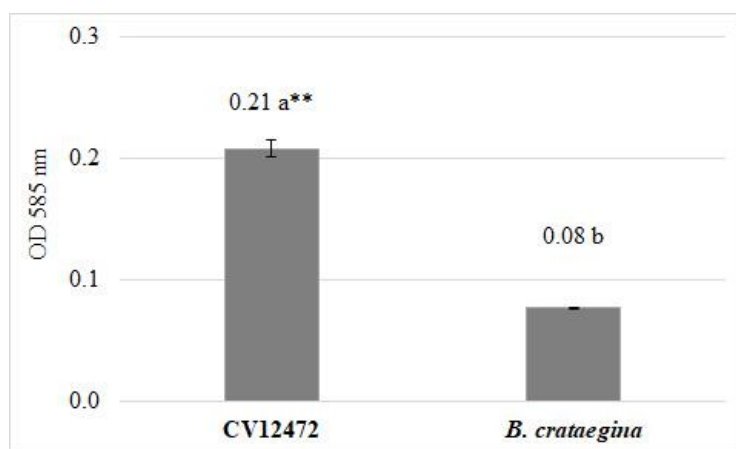
ns insignificant; ne none-effective; \*The averages of zones within columns with the same letter are not importantly different by LSD's at  $p < 0.05$ . \*\*The averages of zones within columns with the same letter are not importantly different by LSD's at  $p < 0.01$ . CN gentamicin.

In the present study, we have researched for the first time the QS inhibitory activity of the methanolic seed extract of *BC* through QS-controlled inhibition of violacein pigment production in *C. violaceum* ATCC 12472. As evident from Figure 1, the extract produced a 66% inhibition in the violacein production at 60 mg/ml concentration, and this result was found to be statistically significant.

HPLC chromatogram of the methanolic seed extract of *BC* shows the presence of gallic, protocatechuic, *p*-hydroxybenzoic, chlorogenic, caffeic, benzoic, cinnamic, *o*-coumaric acid and, rutin, quercetin. Chlorogenic acid had the highest concentration (1974.91  $\mu\text{g/ml}$ ) followed by benzoic acid with a concentration of 548.43  $\mu\text{g/ml}$ , then *p*-hydroxybenzoic acid with a concentration of 278.55  $\mu\text{g/ml}$ , with the presence of caffeic acid, rutin, protocatechuic acid, quercetin, cinnamic acid, *o*-coumaric acid and gallic acid with concentrations of 244.06, 189.55, 94.17, 32.47, 15.42, 7.75 and 7.42  $\mu\text{g/ml}$ ,



respectively (Table 3). The chemical structures of determined compounds in the extract are shown in Figure 2.

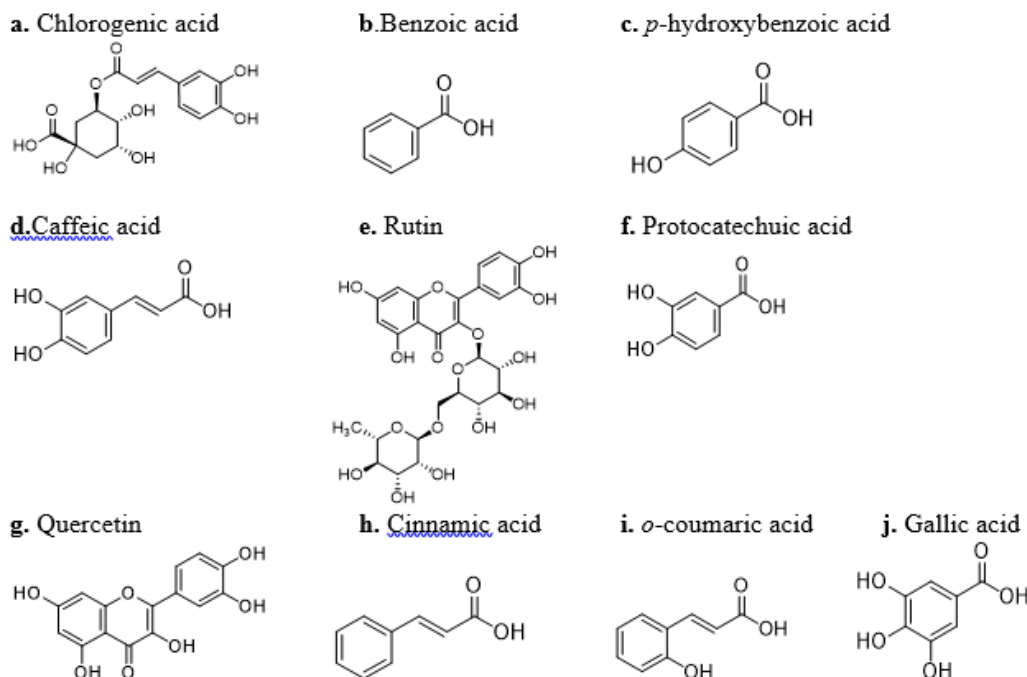


**Figure 1.** Results of the violacein quantification assay

**Table 3.** Concentrations of the main phenolic compounds identified in the methanolic extract of *BC* seeds

Phytochemicals	Concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ )
Chlorogenic acid	1974.91
Benzoic acid	548.43
<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	278.55
Caffeic acid	244.06
Rutin	189.55
Protocatechuic acid	94.17
Quercetin	32.47
Cinnamic acid	15.42
<i>o</i> -coumaric acid	7.75
Gallic acid	7.42

In the literature, there is a large number of reports related to the antibacterial and anti-virulence properties of phenolic phytochemicals. It is well documented that many phenolic secondary metabolites' main target has been the inhibition of the QS system [17-20]. In a study undertaken to research the *in vitro* anti-QS potential of chlorogenic, caffeic, and gallic acids against *S. aureus* it was found that these compounds inhibit the biofilm formation and bacterial adhesion in a dose-dependent manner. It has been determined that phenolic acids interfere with the stability of the cell membrane and the metabolic activity of the cells of *S. aureus* [21]. Similarly, in molecular docking study conducted by Mostafa et al., *p*-hydroxy benzoyl protocatechuic acid glucose, *p*-hydroxy benzoyl galloyl glucose, epicatechin and caffeoylmalic acid were reported being the main active compounds for the anti-QS activity of the methanolic extracts prepared from *Salix tetrasperma* stem bark and flowers. In this study, it was determined that these compounds help for decreasing the spread of bacterial cells by inhibiting protease and hemolysin activity [22]. According to the results of an experiment by Fratianni et al., the presence of rutin in the ethanolic extract prepared from the aerial parts of *Hypericum connatum* is held responsible for anti-QS activity against *C. violaceum* [23]. In a publication examining the effects of dietary phytochemicals (such as flavonoids) as QS inhibitory agents, the inhibition mechanisms of these compounds have been determined as interfering with acylated homoserine lactone (AHL) activity, modulating the synthesis of AHLs and inhibiting the aggregation of pathogenic bacteria known to be modulated by QS [24].



**Figure 2.** Chemical structures of determined phenolic compounds in the methanolic extract of *BC* seeds

Given the growing global public health problem arising from the emergence of bacterial multiple resistances to antibiotics, new drug development studies that target virulence offer hope for overcoming this problem. Therefore, we think that the current research can be an important step in the development of new agents and *Berberis crataegina* might be a promising natural weapon for fighting pathogens.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: F.T.G.D., E.Ö.; Design: F.T.G.D., E.Ö.; Control: F.T.G.D., E.Ö.; Sources: E.Ö., E.A.; Materials: F.T.G.D., E.Ö., E.A.; Data Collection and/or Processing: F.T.G.D., E.Ö., E.A.; Analysis and/or Interpretation: F.T.G.D., E.Ö., E.A.; Literature Review: F.T.G.D., E.Ö.; Manuscript Writing: F.T.G.D., E.Ö.; Critical Review: F.T.G.D., E.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. Wang, S., Gao, Y., Jin, Q., Ji, J. (2020). Emerging antibacterial nanomedicine for enhanced antibiotic therapy. *Biomaterials Science*, 8(24), 6825-6839. [\[CrossRef\]](#)
2. Bouyahya, A., El Omari, N., El Menyiy, N., Gouaguou, F., Balahbib, A., Chamkhi, I. (2022). Anti-Quorum Sensing Agents from Natural Sources. In: V. Kumar, V. Shriram, A. Paul and M. Thakur (Eds.), *Antimicrobial Resistance*, (pp. 533-557). Singapore: Springer.
3. Striednig, B., Hilbi, H. (2022). Bacterial quorum sensing and phenotypic heterogeneity: how the collective shapes the individual. *Trends in Microbiology*, 30(4), 379-389. [\[CrossRef\]](#)
4. Nealson, K.H., Platt, T., Hastings, J.W. (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology*, 104(1), 313-322. [\[CrossRef\]](#)

5. Tay, S.B., Yew, W.S. (2013). Development of quorum-based anti-virulence therapeutics targeting Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 16570-16599. [\[CrossRef\]](#)
6. Albert, E., Albouy, P.A., Ayril, A., Basa, P., Csik, G., Nagy, N., Horvolgyi, Z. (2015). Antibacterial properties of Ag-TiO<sub>2</sub> composite sol-gel coatings. *Rsc Advances*, 5(73), 59070-59081. [\[CrossRef\]](#)
7. Pantanella, F., Berlutti, F., Passariello, C., Sarli, S., Morea, C., Schippa, S. (2007). Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *Journal of Applied Microbiology*, 102(4), 992-999. [\[CrossRef\]](#)
8. De Lima, D.C., Medeiros, I.G., de Cassia Silva-Portela, R., da Silva Junior, F.C., Fassarella Agnez-Lima, L., de Souza, J.E.S., Batistuzzo de Medeiros, S.R. (2021). Identification of plasmids from Brazilian *Chromobacterium violaceum* strains. *Canadian Journal of Microbiology*, 1-10. [\[CrossRef\]](#)
9. Chelliah, R., Banan-MwineDaliri, E., Oh, D.H. (2022). Screening of Actinobacteria for Quorum Sensing Inhibition. In *Methods in Actinobacteriology*, Springer, Humana, New York, p. 479-482.
10. Cárcamo, G., Silva, M., Becerra, J., Urrutia, H., Sossa, K., Paz, C. (2014). Inhibition of quorum sensing by drimane lactones from Chilean flora. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 59(3), 2622-2624. [\[CrossRef\]](#)
11. Isikli, N.D., Yilmaz, I. (2014). Some physical properties of sun-dried *Berberis* fruit (*Berberis crataegina*). *Journal of Food Science and Technology*, 51(1), 104-110. [\[CrossRef\]](#)
12. Gonul, S., Bozkurt, B., Okudan, S., Tugal-Tutkun, I. (2015). Bilateral acute iris transillumination following a fumigation therapy: a village-based traditional method for the treatment of ophthalmomyiasis. *Cutaneous Ocular Toxicology*, 34(1), 80-83. [\[CrossRef\]](#)
13. Charehsaz, M., Sipahi, H., Celep, E., Ustundag, A., Cemiloglu Ulker, O., Duydu, Y., Aydın, A., Yesilada, E. (2015). The fruit extract of *Berberis crataegina* DC: exerts potent antioxidant activity and protects DNA integrity. *Daru Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23, 24. [\[CrossRef\]](#)
14. Gidik, B. (2021). Antioxidant, antimicrobial activities and fatty acid compositions of wild *Berberis* spp. by different techniques combined with chemometrics (PCA and HCA). *Molecules*, 26(24), 7448. [\[CrossRef\]](#)
15. Yesilada, E., Kupeli, E. (2002). *Berberis crataegina* DC. root exhibits potent anti-inflammatory, analgesic and febrifuge effects in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(2), 237-248. [\[CrossRef\]](#)
16. Kaya, M., Ravikumar, P., Ilk, S., Mujtaba, M., Akyuz, L., Labidi, J., Erkul, S.K. (2018). Production and characterization of chitosan based edible films from *Berberis crataegina*'s fruit extract and seed oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 45, 287-297. [\[CrossRef\]](#)
17. Özyayın, A.G., Arın, E., Önem, E. (2020). Türk mutfağında yeni bir fonksiyonel gıda olarak siyah sarımsak (*Allium sativum* L.): Fenolik madde içeriği ve bakteriyel iletişim (quorum sensing) üzerine etkisi. *Akademik Gıda*, 18, 27-35. [\[CrossRef\]](#)
18. Mandal, S.M., Dias, R.O., Franco, O.L. (2017). Phenolic compounds in antimicrobial therapy. *Journal of Medicinal Food*, 20(10), 1031-1038. [\[CrossRef\]](#)
19. Muñoz-Cazares, N., García-Contreras, R., Pérez-López, M., Castillo-Juárez, I. (2017). Phenolic compounds with anti-virulence properties. In: M. Soto-Hernández, M.P. Tenango, R. García-Mateos (Eds.), *Phenolic Compounds: Biological Activity*, (pp.139-167). Croatia: Intech.
20. Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Meier, C., Kahkonen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oksman-Caldentey, K.M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 494-507. [\[CrossRef\]](#)
21. Luís, Á., Silva, F., Sousa, S., Duarte, A.P., Domingues, F. (2014). Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids. *Biofouling*, 30(1), 69-79. [\[CrossRef\]](#)
22. Mostafa, I., Abbas, H.A., Ashour, M.L., Yasri, A., El-Shazly, A.M., Wink, M., Sobeh, M. (2020). Polyphenols from *Salix tetrasperma* impair virulence and inhibit quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*, 25(6), 1341. [\[CrossRef\]](#)
23. Fratianni, F., Nazzaro, F., Marandino, A., Fusco, M., Coppola, R., de Feo, V., de Martino, L. (2013). Biochemical composition, antimicrobial activities and anti-quorum-sensing activities of ethanol and ethyl acetate extracts from *Hypericum connatum* Lam. (Guttiferae). *Journal of Medicinal Food*, 16(5), 454-459. [\[CrossRef\]](#)
24. Vattem, D.A., Mihalik, K., Crixell, S.H., McLean, R.J. (2007). Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. *Fitoterapia*, 78(4), 302-310. [\[CrossRef\]](#)



# FARKLI KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLMİŞ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* İZOLATLARININ ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLİNİN İNCELENMESİ: COVID-19 PANDEMİSİ SÜRECİNDEKİ BİR YILLIK VERİLER

*INVESTIGATION OF THE ANTIBIOTIC RESISTANCE PROFILE OF KLEBSIELLA PNEUMONIAE ISOLATES ISOLATED FROM DIFFERENT CLINICAL SPECIMENS: ONE-YEAR DATA DURING THE COVID-19 PANDEMIC PROCESS*

Derya DOĞANAY<sup>1</sup> , Müzeyyen AYDIN<sup>2\*</sup> , İbrahim Serkan AVŞAR<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 34668, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 34126, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup>Biruni Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, 34010 İstanbul, Türkiye

## ÖZ

**Amaç:** Son yıllarda genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üretimi sonucu ortaya çıkan direncin bakteriler arasında hızla yayılabilmesi *K. pneumoniae* bakterisinin önemini arttırmıştır. Bakterilerin antibiyotik direnç oranlarının düzenli takibi enfeksiyonların tedavisi ve geliştirilebilecek yeni tedavi yöntemleri için oldukça önemlidir. Çalışmada COVID-19 Pandemisini kapsayan Mart 2020 – Mart 2021 tarihleri arasında Biruni Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran hastalardan izole edilen *K. pneumoniae*'lerin antibiyotik direnç profilleri ve GSBL pozitiflik oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada farklı poliklinik ve servislerden gönderilen örneklerden izole edilen *K. pneumoniae* bakterilerinin antibiyogram test sonuçları ve GSBL varlıkları retrospektif olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizler için GraphPad InStat V. 3.05 kullanılmıştır.

\* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Müzeyyen Aydın  
e-posta / e-mail: muzeyyenaydin151@gmail.com, Tel. / Phone: +905548815008

Gönderilme / Submitted : 28.09.2022

Kabul / Accepted : 24.11.2022

Yayınlanma / Published : 20.01.2023

**Sonuç ve Tartışma:** Çalışmada farklı klinik örneklerden 423 *K. pneumoniae* bakterisi izole edilmiştir. İzolatların 161'i (%38) endotrakeal aspirat (ETA) örneğinden, 349'u (%82,5) yoğun bakım kliniğinden elde edilmiştir. Ayrıca izolatların 358'i (%84.63) GSBL pozitif, 65'i (%15.36) GSBL negatif olarak belirlenmiştir. Elde edilen izolatların çoğunluğunun ampisiline karşı, GSBL pozitif olan izolatların tamamına yakınının ise seftazidime karşı dirençli olduğu görülmüştür. Gerek yapılan çalışmalar gerekse çalışmada ortaya çıkan sonuçlar, çoklu antibiyotik direnci gösteren *K. pneumoniae* suşlarının sayısının zaman içerisinde arttığını ve bu artışın katlanarak devam ettiğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Antimikrobiyal direnç, COVID-19, GSBL, hastane enfeksiyonu, *Klebsiella pneumoniae*

## ABSTRACT

**Objective:** In recent years, the rapid spread of resistance caused by the production of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) among bacteria has increased the importance of *K. pneumoniae* bacteria. Regular monitoring of antibiotic resistance rates of bacteria is very important for the treatment of infections and new treatment methods that can be developed. In the study, it was aimed to determine the antibiotic resistance profiles and ESBL positivity rates of *K. pneumoniae* isolated from patients who applied to Biruni University Hospital between March 2020 and March 2021, covering the COVID-19 Pandemic.

**Material and Method:** In the study, antibiogram test results and ESBL presences of *K. pneumoniae* bacteria isolated from samples sent from different outpatient clinics and services were evaluated retrospectively. GraphPad InStat V. 3.05 was used for statistical analysis.

**Result and Discussion:** In the study, 423 *K. pneumoniae* bacteria were isolated from different clinical samples. Of the isolates, 161 (38%) were obtained from the endotracheal aspirate (ETA) sample, and 349 (82.5%) were obtained from the intensive care clinic. In addition, 358 (84.63%) of the isolates were ESBL positive and 65 (15.36%) ESBL negative. It was observed that the majority of the isolates obtained were resistant to ampicillin, and almost all of the ESBL positive isolates were resistant to ceftazidime. Both the studies and the results of the study show that the number of *K. pneumoniae* strains showing multiple antibiotic resistance has increased over time and this increase continues exponentially.

**Keywords:** Antimicrobial resistance, COVID-19, ESBL, *Klebsiella pneumoniae*, nosocomial infection

## GİRİŞ

*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacteriaceae* ailesinde bulunan bir bakteri olup başlıcaları sindirim sistemi, solunum sistemi ve ciltte olmak üzere insan vücudunun birçok farklı noktasında enfeksiyonlara sebep olabilmektedir. Fırsatçı patojen olan bu tür bağışıklık sistemi zayıflamış kişilerde ciddi sağlık sorunlarına neden olurken yüksek mortalite oranlarına yol açabilmektedir [1,2,3].

2019 yılının sonu itibarıyla Çin'in Wuhan kentinde ortaya çıkan ve büyük bir salgın yaratarak tüm dünyaya yayılan COVID-19 hastalığı asemptomatik geçirilebilmekle birlikte, ciddi vakalarda pnömoni, ağır akut solunum yolu enfeksiyonu ve ölüm gelişebilmektedir [4,5]. COVID-19 hastalarının verileri incelendiğinde en sık görülen ko-enfeksiyonların pnömoni (%32.3), bakteriyemi (%24.6) ve idrar yolu enfeksiyonu (%21.5) olduğu tespit edilmiştir [6]. Tüm hastane kaynaklı enfeksiyonların %3-8'inin kaynağı olduğu düşünülen *Klebsiella* türlerinin yol açtığı enfeksiyonların en öne çıkanları da üriner sistem enfeksiyonları, pnömoni, primer bakteriyemi ve piyojenik karaciğer apsidesidir [7,8].

*Klebsiella* türleri doğada, cansız ortamlarda ve memeli hayvanların floralarında yaygın olarak bulunmaktadır. İnsan florasında da bulunan bu fırsatçı tür hastanelerde yatan hastalarda artış göstermektedir. Bu artışta yaygın ve bilinçsiz antibiyotik kullanılması sonucu gelişen antibiyotik direncinin büyük bir önemi vardır [9]. Gram negatif bakteriler için en önemli direnç mekanizması beta-laktamaz sentezidir. Bu bakterilerde bulunan plazmid kaynaklı beta-laktamazlar plazmidler aracılığıyla diğer bakterilere aktarılırlar. Bu enzimler ortaya çıkan mutasyonlar sonucu genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) adı verilen yeni beta-laktamazlar olarak tanımlanmıştır. GSBL üreten suşlarla oluşan enfeksiyonlar yoğun bakım servislerindeki hastalar başta olmak üzere, hastanede uzun süre yatan, kapsamlı cerrahi operasyon geçiren, arteriyel ve üriner kateteri bulunan hastalarda ortaya çıkmaktadır.

GSBL'lerin en yaygın görüldüğü enfeksiyon etkenlerinden biri de hastane kökenli *Klebsiella pneumoniae*'dir [10,11].

Hastane enfeksiyonlarının ana etkenlerinden biri olması ve antibiyotiklere çoklu direnç geliştirebilmesi sebebiyle halk sağlığı için tehdit oluşturan *K. pneumoniae*'nin direnç profilinin belirlenmesi ve düzenli olarak takip edilmesi önem taşımaktadır. Bu direnç gelişimi ve takibi özellikle COVID-19 pandemi döneminde daha da önem kazanmıştır. Bu doğrultuda çalışmada Mart 2020 – Mart 2021 arasındaki bir yıllık süreçte Biruni Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran hastalardan izole edilen *K. pneumoniae*'lerin antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada COVID-19 pandemisinin bir dönemini kapsayan Mart 2020-Mart 2021 tarihleri arasındaki bir yıllık Biruni Üniversitesi Hastanesi verileri retrospektif olarak incelenmiştir. Farklı kliniklerden Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen ve kabul edilme kriterlerine uygun farklı klinik örneklerden izole edilmiş *K. pneumoniae* izolatlarının GSBL varlıkları ile antibiyotik duyarlılık test sonuçları değerlendirilmiştir.

*K. pneumoniae* suşunun izolasyonunda besiyeri olarak MacConkey Agar kullanılmıştır. Bakterilerin tanımlanmasında, antibiyogramında ve GSBL varlığının tespitinde VITEK® 2 (bioMérieux Clinical Diagnostics, France) cihazı kullanılmıştır. Tanımlanan *K. pneumoniae* suşlarının Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MIK) değerleri "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST)'e göre değerlendirilmiştir [12].

Antibiyotik duyarlılık testlerinde ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, piperasilin/tazobaktam, sefuroksim, sefuroksim aksetil, sefoksitin, sefiksim, seftazidim, seftriakson, ertapenem, imipenem, meropenem, amikasin, gentamisin, siprofloksasin, fosfomisin, nitrofurantoin, trimetoprim/sülfametoksazol, oksasilin, eritromisin, klindamisin ve linezolid antibiyotikleri olmak üzere toplamda 22 farklı antibiyotik kullanılmıştır.

Çalışmada hasta ve örneklere ait demografik bilgiler (yaş, cinsiyet, örneklerin gönderildiği klinikler vb) ile laboratuvar sonuçları Microsoft Office Excel programında hazırlanan veri dosyasına girilmiştir. Kullanılan bütün tablo ve grafikler bu program üzerinde hazırlanmıştır. İstatistiksel analizler için GraphPad InStat V. 3.05 kullanılmıştır. Fisher kesin ki-kare testi uygulanmıştır. Tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak kabul edilmiştir.

## SONUÇ VE TARTIŞMA

Çalışmada Biruni Üniversite Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda, çalışma aralığında (Mart 2020-Mart 2021) ayaktan ve yatan hasta olmak üzere 230 farklı hastadan ve farklı klinik örneklerden 423 *K. pneumoniae* bakterisi izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerin 22 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılıkları değerlendirilmiştir.

Çalışmada yer alan hastaların %57'si (n=130) kadın ve %43'ü (n=100) erkektir. Çalışmada herhangi bir yaş aralığı hedeflenmemiş olup hastaların yaş aralıkları 0-100 yaş ve yaş ortalaması 62 yaş olarak saptanmıştır.

Örneklerin alındığı servis, hasta sayısı ve oranları (%) Tablo 1'de verilmiştir. Tablo 1'e göre çalışma sürecinde örnek alınan 230 hastanın % 70'ini (n=161 hasta) yoğun bakımda tedavi gören hastalar oluşturmuştur. *K. pneumoniae* izolatlarının elde edildiği klinik örnekler, sayıları ve oranları (%) ise Tablo 2'de verilmiştir.

Hastalardan alınan toplam 423 örneğin her birinden, birer adet olmak üzere toplamda 423 adet *K. pneumoniae* izole edilmiştir. 423 örneğin, 349 tanesinin (%82.5) yoğun bakım ünitesinden gönderildiği belirlenmiştir. Elde edilen izolatların; 161'i (%38) endotrakeal aspirat (ETA), 117'si (%28) idrar, 52'si (%12) kan, 35'i (%8) balgam, 17'si (%4) katater, 15'i (%4) trakeal aspirat, 5'i (%1) vajinal, 4'ü (%1) yara, 2 tanesi vücut sıvısı ve 1 tanesi ise apse numunesinden elde edilmiştir.

Çalışmada *K. pneumoniae* izolatlarının, 22 farklı antibiyotiğe karşı otomatize sistemle belirlenen duyarlılık test sonuçlarının (R: Dirençli, S: Duyarlı ve I: Orta Duyarlı) yüzde oranları Tablo 3'te verilmiştir. Tablo 3'e göre izolatların tamamı üzerine piperasilin/tazobaktam, seftazidim, meropenem, amikasin, gentamisin, siprofloksasin ve trimetoprim/sülfametoksazol antibiyotiklerinin; %92'sinin

üzerine ampisilin, sefuroksim, sefuroksim aksetil, sefoksitin, seftriakson ve ertapenem antibiyotiklerinin; %40-70'i üzerine imipenem, oksasilin, eritromisin, klindamisin ve linezolid antibiyotiklerinin; %30'u üzerine fosfomisin, nitrofurantoin ve sefiksime antibiyotiklerinin son olarak %15'i üzerine amoksisilin/klavulanik asit antibiyotiklerinin antibiyogram testi yapılarak direnç profilleri belirlenmiştir.

**Tablo 1.** Örneklerin alındığı servis, hasta sayısı ve oranları (%)

Servis Adı	Hasta Sayısı	Yüzde Oranları
Acil	1	0% (0.43)*
Beyin Cerrahi	4	2%
Gastroenteroloji ve Kardiyoloji	2	1%
Çocuk Hastalıkları	9	4%
Enfeksiyon Hastalıkları	4	2%
Genel Cerrahi	3	1%
Göğüs Hastalıkları	2	1%
İç Hastalıkları	5	2%
Kadın Doğum	17	7%
Nefroloji	2	1%
Ortopedi	2	1%
Üroloji	10	4%
Yoğun Bakım	161	70%
Belirlenemeyen	8	3%
Toplam	230	

\*%0.5 ve altındaki değerler %0'a yuvarlanmış ve tabloda bu şekilde gösterilmiştir.

**Tablo 2.** İzolatlarının elde edildiği klinik örnekler, sayıları ve oranları (%)

Örnek Adı	Örnek ve izole edilen <i>K. pneumoniae</i> sayısı	Oran (%)
Endotrakeal Aspirat (ETA)	161	38%
Kan Kültürü	52	12%
Apse	1	0% (0.23)*
Bronkoalveolar Lavaj (BAL)	14	3%
Balgam	35	8%
İdrar	117	28%
Katater	17	4%
Trakeal Aspirat	15	4%
Vajinal Kültür	5	1%
Vücut Sıvısı	2	0% (0.47)*
Yara Sürüntüsü	4	1%
Toplam İzolat	423	

\*%0.5 ve altındaki değerler %0'a yuvarlanmış ve tabloda bu şekilde gösterilmiştir.

Tablo 3 incelendiğinde çalışmada ele alınan izolatların tamamının antibiyotik duyarlılık yüzdelere göre, en yüksek oranla direnç gösterilen antibiyotik (%84) seftazidim olduğu, duyarlılığın en yüksek olduğu (%30) antibiyotik ise amikasin olduğu belirlenmiştir. Çalışmada imipenem antibiyotiklerinin 147 izolat üzerine antimikrobiyal etkisi belirlenmiş olmasına rağmen, %59 (n=87 izolat)'luk duyarlılık oranı ile *K. pneumoniae* bakterisinin duyarlı olduğu antibiyotiklerden birisi olduğu söylenebilir. Ayrıca çalışmada izolatların %92'lik kısmı üzerine etkisi incelenen antibiyotiklerden ampisiline karşı yüksek oranda direnç geliştirdikleri gözlenmiştir.

Tablo 4'te verildiği üzere çalışmada incelenen 423 örneğin 358'i (%84.63) GSBL pozitif, 65'inin (%15.36) ise GSBL negatif olduğu görülmüştür. Çalışmada en yüksek oranda örnek alınan yoğun bakım servisinden izole edilen 349 örneğin, 321'i (%92) GSBL pozitif iken 28'i (%8) GSBL negatif olarak kaydedilmiştir. GSBL üreten ve üretmeyen izolatların %97 'si ve tamamı üzerine yapılan antibiyogram testleri irdelenmiş olup, GSBL pozitif izolatlara düşük oranda olmasına rağmen en etkili antibiyotik amikasin (%17.03)'dir. Ayrıca izolatların seftazidim antibiyotiğine karşı %98 oranında direnç geliştirdikleri belirlenmiş; söz konusu bakterilere karşı piperasilin/tazobaktam (%90.7) ve siprofloksasin (%90.22) antibiyotiklerinin etkisinin yüksek oranda azaldığı tespit edilmiştir.

GSBL negatif izolatların ise %100'ü amikasin ve meropenem antibiyotiğine duyarlı iken, %96,92'sinin ampisilin antibiyotiğine karşı direnç kazandıkları tespit edilmiştir. Çalışma sonuçları istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde GSBL pozitif ve GSBL negatif izolatların antibakteriyel duyarlılıkları arasında anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ).

**Tablo 3.** İzolatların duyarlılık test sonuçlarının yüzde oranları (%)

<i>Klebsiella pneumoniae</i> n=423								
Antibiyotikler	R (Dirençli)		S (Duyarlı)		I (Orta Duyarlı)		Çalışılmayan İzolat Sayısı	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ampisilin	392	100	0	0	0	0	31	7.3
Amoksisilin/Klavulanik Asit	27	49	21	38	7	13	368	86.9
Piperasilin/Tazobaktam	326	77	85	20	12	3	0	0
Sefuroksim	332	85	60	15	0	0	31	7.3
Sefuroksim Aksetil	327	84	60	16	0	0	36	8.5
Sefoksitin	303	78	84	22	0	0	36	8.5
Sefiksım	71	61	45	39	0	0	307	72.5
Seftazidim	354	84	65	15	4	1	0	0
Seftriakson	326	83	66	17	0	0	31	7.3
Ertapenem	287	73	105	27	0	0	31	7.3
Imipenem	37	25	87	59	23	16	276	65.2
Meropenem	296	70	115	27	12	3	0	0
Amikasin	289	68	126	30	8	2	0	0
Gentamisin	314	74	108	26	1	0	0	0
Siprofloksasin	335	79	75	18	13	3	0	0
Fosfomisin	54	47	62	53	0	0	307	72.5
Nitrofurantoin	52	45	64	55	0	0	307	72.5
Trimetoprim/Sülfametoksazol	334	79	89	21	0	0	0	0
Oksasilin	225	95	11	5	0	0	187	44.2
Eritromisin	167	59	56	20	58	21	142	33.5
Klindamisin	152	59	106	41	0	0	165	39
Linezolid	192	89	22	10	1	0	208	49.1

\* $p<0.05$  Anlamlı,  $p>0.05$  Anlamsız ÇİS: Çalışılmayan İzolat Sayısı S: Duyarlı R= Dirençli I: Orta Duyarlı

Antibiyotiklerin kullanılmasının yaygınlaşmasıyla birlikte, bakteriler farklı direnç mekanizmaları geliştirmektedirler. Birden çok antibiyotiğe dirençli bakteri türlerinin hem çevre hem de hastane florasında giderek artması olası enfeksiyon hastalıklarının tedavi imkanlarını sınırlı hale getirmekte ve özellikle COVID-19 pandemi sürecinde ikincil enfeksiyonların gelişmesi ile birlikte morbidite-mortalite



oranlarının artışında rol almaktadır. Bu nedenle bakterilerin antibiyotik direnç oranlarının düzenli takibi dirençli bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisi için oldukça önemlidir.

*Klebsiella pneumoniae* bakterisi özellikle bağışıklık sistemi zayıflamış olan bireylerde cerrahi yara yeri, pnömoni, bakteriyemi, üriner ve solunum sistemi enfeksiyonları gibi ciddi enfeksiyonlara neden olabilir. Hastane kaynaklı *K. pneumoniae* bakterisi, çoklu antibiyotik direnci geliştirebilme yeteneğine sahip olması (özellikle GSBL varlığı) ve kazanılan bu direncin bakteriler arasında hızla yayılması nedeniyle oldukça önem arz etmektedir [13,14]. *K. pneumoniae* bakterisinin farklı ülkelerde ve ülkelerin farklı bölgelerinde geliştirdiği direnç oranı değişkenlik gösterebilir. Bu sebeple kurumların antibiyotik direnç profillerinin düzenli olarak incelenmesi; direnç geliştiren bakterilerin tespiti, dirençli bakterilerin yayılmasının engellenmesi, direnç geliştiren bakterilerin sebep olabileceği enfeksiyonların önlenmesi ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için son derece önemlidir [15,16,17].

**Tablo 4.** İzolatların GSBL üretim durumları ve yüzde oranları (%)

Antibiyotikler	<i>Klebsiella pneumoniae</i> n=423																Fisher'ın Ki-Kare Testi	
	GSBL (+) n= 358								GSBL (-) n= 65									
	R		S		I		ÇİS		R		S		I		ÇİS			
n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	p değeri		
Ampisilin	32 9	91. 8	0	0	0	0	2	8. 9	1	6 3	96. 9	0	0	0	0	2 7	3.0 7	1
Piperasilin/ Tazobaktam	32 5	90. 7	2 6	7. 3	7	2	0	0	1	1.5 3	5 9	90. 7	5	7. 7	0	0	0	0.0001
Sefuroksim	32 9	91. 8	0	0	0	0	2 9	8. 1	3	4.6	6 0	92. 3	0	0	2	3.0 7	0.0001	
Sefuroksim Aksetil	32 4	90. 5	0	0	0	0	3 4	9. 4	3	4.6	6 0	92. 3	0	0	2	3.0 7	0.0001	
Sefoksitin	29 5	82. 4	2 9	8. 1	0	0	3 4	9. 4	8	12. 3	5 5	84. 6	0	0	2	3.0 7	0.0001	
Seftazidim	35 4	98. 8	0	0	4	1	0	0	0	0	6 5	100	0	0	0	0	0.0001	
Seftriakson	32 6	91. 0	3	0. 8	0	0	2 9	8. 1	0	0	6 3	96. 9	0	0	2	3.0 7	0.0001	
Ertapenem	28 7	80. 1	4 2	12	0	0	2 9	8. 1	0	0	6 3	96. 9	0	0	2	3.0 7	0.0001	
Meropenem	29 6	82. 6	5 0	14	1 2	3	0	0	0	0	6 5	100	0	0	0	0	0.0001	
Amikasin	28 9	80. 7	6 1	17	8	2	0	0	0	0	6 5	100	0	0	0	0	0.0001	
Gentamisin	30 7	85. 7	5 0	14	1	0	0	0	7	10. 7	5 8	89. 2	0	0	0	0	0.0001	
Siprofloksasin	32 3	90. 2	2	6. 1	1 3	4	0	0	1 2	18. 4	5 3	81. 5	0	0	0	0	0.0001	
Trimetoprim/ Sülfametoksazo l	32 1	89. 6	3 7	10	0	0	0	0	1 3	20	5 2	80	0	0	0	0	0.0001	

\*p<0.05 Anlamli, p>0.05 Anlamsız ÇİS: Çalışılmayan İzolat Sayısı S: Duyarlı R= Dirençli I: Orta Duyarlı

Bu nedenle çalışmada COVID-19 pandemisi süresini içeren 2020-2021 tarihleri arasında İstanbul ili Florya İlçesi'nde yer alan Biruni Üniversitesi Hastanesi'nin bir yıllık antibiyogram verileri *K. pneumoniae* bakterisi açısından değerlendirilmiştir. Hastanede 14 farklı kliniğe, yatan ve ayaktan başvuran 270 hastanın farklı klinik örneklerinden 423 adet *K. pneumoniae* bakterisi izolatı elde edilmiştir

Yapılan çalışmalar özellikle dirençli bakterilerden kaynaklı hastane enfeksiyonlarının sık görüldüğü alanların yoğun bakım üniteleri olduğunu ifade etmektedir. Hastanelerin genelinde ortaya çıkan hastane enfeksiyonlarının oranı %5-10 iken, yoğun bakım ünitelerinde bu oran %20-25'lerin üzerine çıkabilmektedir [18,19]. Çalışmada %82.5'lük oranla (n=349) en fazla izolatu yoğun bakım

ünitesinden izole edildiği; bu izolatların ise %92'sinin GSBL pozitif olduğu tespit edilmiştir. Yoğun bakım ünitelerinde özellikle genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) varlığına sahip *K. pneumoniae* bakterisinin yüksek oranlarda tespit edilmesi kaygı verici olmakla birlikte çalışma sonuçları literatür bilgisini desteklemektedir.

Çalışmada *K. pneumoniae* izolatlarının tamamının en duyarlı olduğu antibiyotiğin amikasin (%30), en yüksek direnç oranının saptandığı antibiyotiğin ise seftazidim (%84) olduğu belirlenmiştir.

2012-2013 yılları arasında yapılan çalışmalarda amikasin duyarlılığı %97.4, %98.9, %98, %95, %82.3, %100, %99 ve %83.3 olarak tespit edilmiştir [17,20,21,22,23,24,25,26]. Duran vd. [27] son yıllarda yaptıkları çalışmada amikasin direncini %19.4 olarak ifade etmişlerdir. Çalışmada ise amikasin antibiyotiğine karşı direncin %68, duyarlılığın ise %30 olduğu ortaya konmuş ve daha önce yapılan çalışmalara göre duyarlılığın çok yüksek oranlarda düştüğü direncin arttığı belirlenmiştir. On yıllık bir süreç sonrasında amikasine olan direncin bu derece artmış olması düşündürücüdür.

Çalışmaya paralel zamanda gerçekleştirilen Aytaç vd. [28]'nin pandemi öncesinde ve sırasında antibiyotik duyarlılıklarını inceleyen çalışmalarında, amikasin duyarlılığının pandemi öncesinde %34.8; pandemi döneminde ise %54.4 olduğu tespit edilmiştir. Aytaç vd.'nin sonuçları çalışmayı ve geçmiş yıllara göre artan amikasin direncini destekler niteliktedir. Ancak çalışma sonuçları ile Aytaç vd.'nin çalışma sonuçları karşılaştırıldığında amikasin duyarlılıkları arasında görülen fark her merkezin kendi antibiyotik duyarlılık takibini yapmasının önemini göstermektedir.

Çalışmada incelenen izolatların çoğunluğuna amikasinden sonra en etkili antibiyotiğin imipenem olduğu belirlenmiştir. *K. pneumoniae* bakterisinin antibiyotik direnç profilini belirlemek amacıyla 2007-2013 yılları arasında yapılan 12 çalışmada imipenem duyarlılığının %100, %99, %97.4, %96 ve %93.3 olduğu [17,20,24,25,29,30,31,32,33,34] ; 2016-2019 yıllarını kapsayan Duran vd. [27] tarafından yapılan çalışmada imipenem direncinin %20.6 olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada ise imipenem direncinin %25, duyarlılığının %59, orta duyarlılığının %16 olduğu tespit edilmiştir. Çalışma verileri karşılaştırıldığında zaman içerisinde imipenem direncinde yüksek oranda artış olduğu görülmektedir. Çalışma süresine paralel gerçekleştirilen Aytaç vd. [28]'nin çalışmalarında ise imipenem duyarlılığının pandemi öncesinde %73.9 iken pandemi döneminde %36.4 olduğu ifade edilmiştir. Bu çalışma ile Aytaç ve vd.'nin verileri desteklenmiş olup COVID-19 sürecinde gelişen ikincil enfeksiyonların tedavisinde kullanılacak antibiyotik tedavi seçeneklerinin sınırlandığı, oluşan antibiyotik direncinin hem pandemi sürecinde hemde sonrasında halk sağlığını oldukça tehdit eden bir faktör olarak kendini bir daha gösterdiği göz önüne konulmuştur.

Çalışmada elde edilen izolatların tamamı ve %92'lik kısmına uygulanan antibiyotikler ele alındığında en yüksek direncin seftadizim (%84) ve ampisilin (%100) antibiyotiklerine karşı olduğu görülmektedir.

*K. pneumoniae* ampisilin direncini Uzun vd. [34] %84, İstanbullu Tosun vd. [35] yatan hastalarda %100-ayaktan hastalarda %97.3, İgan ve Hancı [32] ise %71.4 olarak belirlemişlerdir. Farklı çalışmalarda farklı direnç oranları ile karşılaşılrken yıllar içerisinde merkezlerin direnç oranlarının değiştiği gözlenmektedir. Bu durumun izolatların elde edildiği örneklerin, kliniklerin ve hasta başvuru durumlarının direnç üzerine etkisinden kaynaklı olduğu söylenebilir. Ayrıca Tanrıverdi Çaycı vd. [4] tarafından COVID-19 tanısı alan hastalardan alınan örnekler ile yapılan çalışmada *K. pneumoniae* izolatlarının ampisilin direnci %100 olarak saptanmıştır. Çalışmanın COVID-19 döneminde yapılması ve incelenen izolatların yüksek oranda yoğun bakım ünitesinden elde edildiği göz önüne alındığında çalışma verileri literatür çalışması verilerini destekler niteliktedir.

2014 ve sonrası yapılan farklı çalışmalarda seftazidim direnç oranları %46-%74.1 arasında değişkenlik göstermektedir. Aytaç vd. [28] tarafından yapılan çalışmada seftazidim direncinin pandemi öncesinde %78.3 ve pandemi döneminde %90.9 olduğu; Tanrıverdi Çaycı vd. [4] tarafından yapılan çalışmada ise direnç oranının %40 olduğu ifade edilmiştir. Çalışmada ise direnç oranı %84 olarak tespit edilmiş; seftazidim duyarlılığının geçmiş yıllara göre azaldığı gözlenmiştir. Özellikle pandemi döneminde izole edilen suşların direnç oranlarının yüksek olması dikkat çekicidir.

Bu iki antibiyotiği %85, %84, %83, %79, %78, %77, %74, %73, %70 direnç oranları ile sırasıyla sefuroksim, sefuroksim aksetil, seftriakson, siprofloksasin, trimetoprim/sülfametoksazol, sefoksitin, piperasilin/tazobaktam, gentamisin, ertapenem ve meropenem antibiyotikleri izlemektedir.

Çalışmada irdelenen bu antibiyotiklerle ilgili Aytaç vd. [28]'nin çalışma verileri pandemi sürecinde (ps) izolatların siprofloksasin (pö:%21.7- ps:%9.1), gentamisin (pö:%43.5-ps:%45.5), meropenem (pö:%30.4-ps:%27.3), piperasilin/tazobaktam (pö:%17.4-ps:%9.1), trimetoprim/sülfametoksazol (pö:%26.9-ps:%27.3) antibiyotiklerine karşı çoğunluğunun duyarlılıklarını, pandemi öncesine (pö) göre kaybettiğini göstermektedir. Tanrıverdi Çaycı vd. [4] ise çalışmalarında *K. pneumoniae* izolatlarının direnç oranlarını sefuroksim %80, seftriakson %70, siprofloksasin %65, piperasilin/tazobaktam %40, ertapenem %35, gentamisin %25 ve trimetoprim/sülfametoksazol %25 olarak bildirmişlerdir. Pandemi sürecinde verilen her iki literatür bilgisi ile çalışma sonuçları paralellik göstermekte olup çalışmada incelenen izolat sayısı diğer yayınlara oranla daha fazladır. Taranan pandemi öncesindeki diğer yayınlar, çalışmada irdelenen her bir antibiyotiğe karşı *K. pneumoniae* direncinin yıllar içerisinde arttığını ve bu artışın devam etmekte olduğunu göstermektedir.

Hastane enfeksiyonlarının içerisinde çoklu antibiyotik direncine sahip *K. pneumoniae* suşlarının oluşturabileceği enfeksiyonlar pandemi sürecinde bir daha önem kazanmıştır. Hem ülke hem de dünya genelinde Gram negatif bakteriler için önemli bir direnç mekanizması olan genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) varlığının artması ve genetik faktörler ile hızlı bir şekilde yayılabilmesi olası direnç gelişimini desteklemektedir [14]. Özellikle COVID-19 pandemi sürecinde çoklu dirence sahip bakterilerin meydana getirdikleri ikincil enfeksiyonların gelişmesi hastanelerdeki kalış süreleri ve mortalite oranlarını arttırmıştır. Zhang H. vd. [36] ikincil enfeksiyonların %50'sine Gram negatif bakterilerin neden olduğunu ve bunların içerisinde en sık rastlanan patojenlerden birinin de *K. pneumoniae* olduğunu ifade etmişlerdir. GSBL direncinin en sık görüldüğü *K. pneumoniae* kontaminasyonları bu nedenle bir daha önem kazanmaktadır.

Ülkemiz genelinde yayınlanan çalışma sonuçları irdelendiğinde ortalama GSBL pozitiflik oranı 1996-2001 yılları arasında %8.09, 2002-2007 yılları arasında %10.61, 2007-2012 yılları arasında %28.17 olarak tespit edilmiştir [37]. Aydemir vd. [38] 2014-2016 yıllarına ait verileri değerlendirdikleri çalışmalarında 439 adet *K. pneumoniae* izolatından 137 (%31)'sinin GSBL pozitif olduğunu; yıllara göre GSBL pozitif *K. pneumoniae* izolat dağılımını ise 2014 yılında %23, 2015 yılında %32 ve 2016 yılında %37 olarak bildirmişlerdir. Ayrıca yıllar içerisindeki GSBL artışını (p=0.011) istatistiksel olarak anlamlı bulduklarını ifade etmişlerdir.

2020-2021 yıllarını kapsayan bu çalışmada incelenen 423 *K. pneumoniae* izolatının %84.63'ü GSBL pozitif iken %15.36'sının ise GSBL negatif olduğu tespit edilmiştir. Çalışma ile geçmiş veriler karşılaştırıldığında GSBL direnç oranının zamanla arttığı ve bu artışın hızla devam ettiği ortaya konulmuştur. Bu direnç artışı ile farklı antibiyotiklere karşı direnç oranlarının da artabileceği riski ön plana çıkmaktadır. Nitekim çalışmada GSBL pozitif izolatların seftazidim ve piperasilin/tazobaktam antibiyotiklerine karşı %90'dan daha yüksek oranlarda direnç kazandıkları belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen veriler ve literatür karşılaştırıldığında; genel olarak çalışmalarda elde edilen verilerin çalışma sonuçlarımızla uyumlu olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak toplum kaynaklı enfeksiyonların yanı sıra hastane enfeksiyonlarının da önemli etkenlerinden biri olan *K. pneumoniae* yoğun bakım ünitelerinde de pnömoni ve bakteriyemilerin önemli bir kısmından sorumludur. Çalışmada ele alınan izolatların çoğunluğu yoğun bakım ünitesinde tedavi olan hastalardan elde edilmiş olup, çalışmada kullanılan antibiyotiklerin çoğuna yüksek direnç oranları saptanmıştır. Gerek yapılan çalışmalar gerekse çalışmada ortaya çıkan sonuçlar, çoklu antibiyotik direnci geliştiren *K. pneumoniae* suşlarının sayısının zaman içerisinde artmakta olduğunu göstermiştir. Özellikle çalışma süresini içine alan COVID-19 pandemi döneminde bu artışın önemi ortaya konmuştur.

Bulgular sonucu pandemi sürecinde *K. pneumoniae* bakterisinin sebep olabileceği enfeksiyonlara karşı yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulabileceği kanısına varılmıştır. Ancak çalışmamızdaki en önemli kısıtlılık, çalışmanın yürütüldüğü hastanede, örnek toplama döneminde seftazidim/avibaktam kombinasyonu için duyarlılık testlerinin olmayışdır. Avibaktam; A, C ve D sınıfı beta laktamaz enzimlerini kovalent bağlarla bloke edebilmektedir [36]. Özellikle seftazidime dirençli GSBL pozitif suşların, seftazidim/avibaktam kombinasyonuna duyarlılığının da incelenmesi gelecek çalışma verilerinin değerlendirilmesine önemli bir katkı sağlayacaktır. Ayrıca yapılan çalışmalar antibiyotik direncinin bölgesel ve ulusal farklılıklar gösterebileceğini ortaya koymakta ve bölgesel verilerin belirlenmesine yönelik epidemiyolojik çalışmaların artırılmasının ampirik tedavide

klisyonerlere yol göstermesi açısından yararlı olacağı düşünülmektedir. *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının tedavisinde uygulanacak ampirik tedavinin seçiminde kültür ve antibiyotik duyarlılık testlerinden elde edilen verilere göre hareket edilmesinin önemi bir kez daha ortaya konmuştur. Artan direnç profillerini engellemek ve dirençli suşların yayılmasını engellemek adına enfeksiyon kontrol önlemleri ve akılcı antibiyotik kullanımı politikalarına uyulması önerilmektedir.

## YAZAR KATKILARI

Kavram: D.D., M.A., İ.S.A.; Tasarım: D.D., M.A., İ.S.A.; Denetim: D.D., M.A., İ.S.A.; Kaynaklar: D.D., M.A., İ.S.A.; Malzemeler: D.D., M.A., İ.S.A.; Veri Toplama ve/veya İşleme: D.D., M.A., İ.S.A.; Analiz ve/veya Yorumlama: D.D., M.A., İ.S.A.; Literatür Taraması: D.D., M.A., İ.S.A.; Makalenin Yazılması: D.D., M.A., İ.S.A.; Kritik İnceleme: D.D., M.A., İ.S.A.; Diğer: -

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

## ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma için T.C. Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 27.10.2022 tarihinde onay alınmıştır. Karar no: 2022/75-09.

## KAYNAKLAR

1. Broberg, C.A., Palacios, M., Miller, V.L. (2014). Klebsiella: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. F1000prime Reports, 6. [CrossRef]
2. Shon, A.S., Bajwa, R.P., Russo, T.A. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) Klebsiella pneumoniae: a new and dangerous breed. Virulence, 4(2), 107-118. [CrossRef]
3. Xu, L., Sun, X., Ma, X. (2017). Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 16(1), 1-12. [CrossRef]
4. Çaycı, Y.T., Seyfi, Z., Vural, D.G., Bilgin, K., Birinci, A. (2022). COVID-19 Tanısı Alan Hastaların Bakteriyel Kültür Örneklerindeki Üremelerin ve Antibiyotik Duyarlılıklarının İncelenmesi. Sağlık Bilimlerinde Değer, 12(2), 203-207. [CrossRef]
5. Gürlevik, S.L. (2020). Koronavirüsler ve yeni koronavirüs SARS-CoV-2. Çocuk Enfeksiyon Dergisi, 14(1), 46-48. [CrossRef]
6. He, Y., Li, W., Wang, Z., Chen, H., Tian, L., Liu, D. (2020). Nosocomial infection among patients with COVID-19: A retrospective data analysis of 918 cases from a single center in Wuhan, China. Infection Control & Hospital Epidemiology, 41(8), 982-983. [CrossRef]
7. Pendleton, J.N., Gorman, S.P., Gilmore, B.F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. Expert Review of Anti-infective Therapy, 11(3), 297-308. [CrossRef]
8. Podschun, R., Ullmann, U. (1998). Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clinical Microbiology Reviews, 11(4), 589-603. [CrossRef]
9. Derin, E. (2010). Yüksek Lisans Tezi. Üroloji kliniğinde üriner enfeksiyon etkeni olan *Klebsiella* spp. ve *Escherichia coli* izolatlarında antibiyotik direnci ve klonal yayılımın araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.
10. Roy, C., Foz, A., Segura, C., Tirado, M., Foster, C., Reig, R. (1983). Plasmid-determined  $\beta$ -lactamases identified in a group of 204 ampicillin-resistant Enterobacteriaceae. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 12(5), 507-510. [CrossRef]
11. Sirot, D. (1995). Extended-spectrum plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 36(suppl\_A), 19-34. [CrossRef]
12. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. From <http://www.eucast.org> Erişim tarihi: 29.06.2022
13. Ahmad, T.A., El-Sayed, L.H., Haroun, M., Hussein, A.A., El Sayed, H. (2012). Development of immunization trials against *Klebsiella pneumoniae*. Vaccine, 30(14), 2411-2420.
14. Orucu, M., Geyik, M.F. (2008). Yoğun bakım ünitesinde sık görülen enfeksiyonlar. Duzce Medical Journal, 10(1), 40-43. [CrossRef]

15. Bali, E.B., Acik L., Sultan, N. (2010). Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum beta-lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital. *African Journal of Microbiology Research*. 4(8), 650-654. [\[CrossRef\]](#)
16. Gröbner, S., Linke, D., Schütz, W., Fladerer, C., Madlung, J., Autenrieth, I.B., Pfeifer, Y. (2009). Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates at the university hospital of Tübingen, Germany. *Journal of Medical Microbiology*, 58(7), 912-922. [\[CrossRef\]](#)
17. Parlak, M., Çıkman, A., Bektaş, A., Berktaş, M. (2012). *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretimi ve antibiyotiklere direnç: Beş yıllık izlem. *Sakarya Tıp Dergisi*, 2(1), 11-15. [\[CrossRef\]](#)
18. Aydemir, Ö., Demiray, T., Köroğlu, M., Aydemir, Y., Karabay, O., Altındış, M. (2016). Yoğun Bakım Ünitelerinde Yatan Hastaların Endotrakeal Aspirat Örneklerinden İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılıkları. *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1(4), 1-8.
19. Ölmez Z. (2016). Yüksek Lisans Tezi. Yıllara göre *Klebsiella pneumoniae*'da antibiyotik direncinin irdelenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye.
20. Adams-Sapper, S., Sergeevna-Selezneva, J., Tartof, S., Raphael, E., Diep, B.A., Perdreau-Remington, F., Riley, L.W. (2012). Globally dispersed mobile drug-resistance genes in gram-negative bacterial isolates from patients with bloodstream infections in a US urban general hospital. *Journal of Medical Microbiology*, 61(Pt 7), 968. [\[CrossRef\]](#)
21. Galani, I., Souli, M., Daikos, G.L., Chrysouli, Z., Poulakou, G., Psychogiou, M., Petrikos, G. (2012). Activity of plazomicin (ACHN-490) against MDR clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Enterobacter* spp. from Athens, Greece. *Journal of Chemotherapy*, 24(4), 191-194. [\[CrossRef\]](#)
22. Güner, Ş.N., Göktürk, B., Bayrakçı, U.S., Baskın, E. (2012). Çocuklarda idrar örneklerinden saptanan toplum kaynaklı gram negatif mikroorganizmaların dağılımı ve 2003-2010 yılları arasında antibiyotik direncindeki artışın değerlendirilmesi. *Türk Pediatri Arşivi*, 47 (2), 107-113. [\[CrossRef\]](#)
23. Güneş, H., Donma, M., Nalbantoğlu, B., Aydın, M., Kaya, A., Topçu, B. (2013). Namık Kemal Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'ne başvuran çocuklarda idrar örneklerinden izole edilen etkenler ve antibiyotik direnç durumları. *Cumhuriyet Medical Journal*, 35(1), 1-8. [\[CrossRef\]](#)
24. Hashemi, S.H., Esna, A.F., Tavakoli, S., Mamani, M. (2013). The prevalence of antibiotic resistance of Enterobacteriaceae strains isolated in community-and hospital-acquired infections in teaching hospitals of Hamadan, west of Iran. *Journal of Research in Health Science*, 13 (1), 75-80.
25. Rammaert, B., Goyet, S., Beauté, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae* related community-acquired acute lower respiratory infections in Cambodia: clinical characteristics and treatment. *BMC Infectious Diseases*, 2(1), 1-7. [\[CrossRef\]](#)
26. Terzi, H.A., Karakeçe, E., Çiftci, İ.H. (2013). *Klebsiella* spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirmesi. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, (2), 68-71. [\[CrossRef\]](#)
27. Duran, H., Çeken, N., Atık, T.K. (2021). Bacteria Isolated from Endotracheal Aspirate Samples and Antibiotic Resistance Rates: 5-year Analysis: 5-year Retrospective Analysis. *Türkiye Klinikleri. Tıp Bilimleri Dergisi*, 41(3), 327-334. [\[CrossRef\]](#)
28. Aytac, Ö., Şenol, F.F., Şenol, A., Öner, P., Toraman, Z.A. (2022). COVID-19 Pandemisi Öncesi ve Sırasında Yoğun Bakım Ünitesi Hastalarından Alınan Kan Kültürü İzolatlarının Tür Dağılımı ve Antibiyotik Duyarlılık Profillerinin Karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 52(1), 39-47. [\[CrossRef\]](#)
29. Ağca, H. (2011). *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üretimleri ve antibiyotik duyarlılık oranları. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 25(3), 169-173.
30. Öztürkoğlu, D. (2016). Yüksek Lisans Tezi. Rize ili'ndeki çeşitli hastanelerden izole edilen *Klebsiella pneumoniae* suşlarında antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi ve beta-laktamaz genlerinin araştırılması. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Rize, Türkiye.
31. Gazi, H., Sürücüoğlu, S., Kurutepe, S. (2007). İdrar kültürlerinden izole edilen Gram negatif bakterilerde antibiyotiklere direnç. *Ankem Dergisi*, 21(1), 19-22.
32. İgan, H., Hancı, H. (2022). Dört Yıllık Süreçte Yoğun Bakım Ünitesinde Yatan Hastaların İdrar Kültürlerinde Üreyen Mikroorganizmaların Dağılımı ve İzole Edilen Gram-negatif Bakterilerin Antibiyotik Dirençleri. *Turkish Journal of Intensive Care*, 20(1), 25-30. [\[CrossRef\]](#)

33. Uyanık, M.H., Hancı, H., Yazgı, H., Karameşe, M. (2010). Kan kültürlerinden soyutlanan *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında GSBL sıklığı ve ertapenem dahil çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları. *Ankem Dergisi*, 24(2), 86-91.
34. Uzun, B.K., Güngör, S., İlgün, M.Ş., Özdemir, R., Baran, N., Ergin, Ö.Y. (2012). Kan kültürlerinden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığı ve in-vitro antibiyotiklere direnç paternleri. *Ankem Dergisi*, 26(4), 181-186. [\[CrossRef\]](#)
35. İstanbullu Tosun, A., Demirci, M., Yılmaz, M., Şen, H., Sirekbasan, L., Gözün Şaylan, E., Şengil, A. Z. (2016). İdrar yolu infeksiyonlarından izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının antimikrobiyal direnç oranları. *Ankem Dergisi*, 30(1), 1-6. [\[CrossRef\]](#)
36. Zhang, H., Zhang, Y., Wu, J., Li, Y., Zhou, X., Li, X., Zhang, W. (2020). Risks and features of secondary infections in severe and critical ill COVID-19 patients. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 1958-1964. [\[CrossRef\]](#)
37. Aykan, Ş.B., Çiftçi, İ.H. (2013). Türkiye’de idrar kültürlerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarının antibiyotiklere direnç durumu: Bir meta-analiz. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 47(4), 603-618.
38. Aydemir, Ö., Terzi, H.A., Köroğlu, M., Altındış, M. (2019). Genişlemiş spektrumlu Beta-laktamaz üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında piperasilin/tazobaktam invitro etkinliği. *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi*, 4(2), 118-127. [\[CrossRef\]](#)



## EVALUATION OF ZERUMBONE AS AN EGFR TYROSINE KINASE INHIBITOR BY MOLECULAR DOCKING METHOD

*MOLEKÜLER YERLEŞTİRME YÖNTEMİYLE ZERUMBONUN EGFR TİROZİN KİNAZ  
İNİHİTÖRÜ OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ*

Dilek YONAR<sup>1\*</sup> , Burcu BABA<sup>2</sup> , Arzu KARAYEL<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Yuksekt İhtisas University, Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Ankara, Turkey

<sup>2</sup>Yuksekt İhtisas University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Ankara,  
Turkey

<sup>3</sup>Hitit University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Physics, Çorum, Turkey

### ABSTRACT

**Objective:** EGFR-TK domain is of great importance in the initiation and progression of various cancer types, especially lung cancer. The existing EGFR-TK inhibitors have numerous side effects, which make them improper to be utilized as cancer therapeutics. In this study, we aimed to analyze the activity of zerumbone as an anticancer agent targeting EGFR by molecular docking approach and to evaluate its activity in comparison with curcumin.

**Material and Method:** MEP and HOMO-LUMO analyses were achieved at B3LYP/6-31G(D,P) level to evaluate electrostatic interactions that affect binding of EGFR with zerumbone and curcumin. Their binding energies were determined by molecular docking and compared with erlotinib as reference ligand.

**Result and Discussion:** Docking studies showed higher bindings (lower binding energy) for curcumin and zerumbone with binding energies -8.0 and -7.6 kcal/mol, respectively, compared to erlotinib (-7.3 kcal/mol). However, there is no significant difference between them. The  $\Delta E$  energy gap of zerumbone was 5.09 eV which implies that this compound has more stability in comparison with curcumin ( $\Delta E=3.68$  eV) and erlotinib ( $\Delta E=4.29$  eV). Also, zerumbone showed strong hydrogen bond interactions with EGFR, making it candidate as EGFR inhibitor, as did both in curcumin and erlotinib. It was concluded that zerumbone may have potential for inhibitory activity against EGFR-TK.

**Keywords:** Curcumin, epidermal growth factor receptor, lung cancer, molecular docking, zerumbone.

\* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Dilek Yonar  
e-mail / e-posta: dilekyonar81@gmail.com, Phone / Tel.: +903123291010/268



## ÖZ

**Amaç:** EGFR-TK bölgesi, başta akciğer kanseri olmak üzere çeşitli kanser türlerinin başlaması ve ilerlemesinde büyük önem taşımaktadır. Mevcut EGFR-TK inhibitörlerinin çeşitli yan etkilerinin varlığı, onların uygun kanser terapötikleri olarak kullanılmasını sınırlandırmaktadır. Bu çalışmada, moleküler yerleştirme yaklaşımı ile EGFR'yi hedef alan bir antikanser ajan olarak zerumbonun aktivitesini analiz etmeyi ve aktivitesini kurkumin ile karşılaştırmalı olarak değerlendirmeyi amaçladık.

**Gereç ve Yöntem:** EGFR'nin zerumbon ve kurkumin ile bağlanmasını etkileyen elektrostatik etkileşimleri değerlendirmek için B3LYP/6-31G(D,P) seviyesinde MEP ve HOMO-LUMO analizleri yapıldı. Bağlanma enerjileri moleküler yerleştirme ile belirlendi ve referans ligand olarak erlotinib ile karşılaştırıldı.

**Sonuç ve Tartışma:** Yerleştirme çalışmaları, erlotinib (-7.3 kcal/mol) ile karşılaştırıldığında, sırasıyla -8.0 ve -7.6 kcal/mol bağlanma enerjileriyle kurkumin ve zerumbon için daha yüksek bağlanmalar (düşük bağlanma enerjisi) gösterdi. Ancak aralarında önemli bir fark gözlenmedi. Zerumbonun  $\Delta E$  enerji aralığı 5.09 eV olarak bulundu. Bu sonuç, bu bileşiğin kurkumin ( $\Delta E=3.68$  eV) ve erlotinib ile karşılaştırıldığında ( $\Delta E=4.29$  eV) daha fazla kararlılığa sahip olduğu anlamına gelmektedir. Ayrıca, zerumbon EGFR ile güçlü hidrojen bağı etkileşimleri gösterdi ve bu da onun hem kurkumin hem de erlotinib'deki gibi EGFR inhibitörü olarak potansiyeli olduğunu göstermiştir. Zerumbonun EGFR-TK'ye karşı inhibitör aktiviteye sahip olabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Akciğer kanseri, epidermal büyüme faktörü reseptörü, kurkumin, moleküler yerleştirme, zerumbon.

## INTRODUCTION

Lung cancer is one of the main causes of cancer-linked deaths worldwide [1]. Its overall 5-year survival rate is 22.9%, with a median survival time of 12 months [2]. Lung cancer is mainly known to have two groups: non-small cell lung cancer (NSCLC) and small cell lung cancer (SCLC). While NSCLC constitutes 80% of all lung cancers, SCLC accounts for 15% and other cancers for 5%. The most common histological subtypes in NSCLC are adenocarcinoma, squamous carcinoma, and large cell carcinoma [3]. Lung cancer does not show obvious symptoms until it reaches the locally advanced or widespread disease stage.

Dysregulation of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling is often found in lung cancer and EGFR level is associated with advanced stage of the disease and poor prognosis. EGFR overexpression has been demonstrated in 40% to 80% of NSCLC biopsies and connected with shorter survival times of NSCLC patients [4–6].

EGFR belongs to the growth factor receptor tyrosine kinases (TKs) family. EGFR-TKs implicated in key cellular functions including cell proliferation, division, and differentiation as previously described. EGFR activation is concluded with activation of Raf/MEK/Erk, STAT, and P13k/AKT pathways leading to cell survival [7]. Since EGFR-driven signaling participate in lung tumorigenesis and tumor progression, targeting the inhibition of EGFR signaling can be a potential and effective therapeutic strategy for NSCLC.

In the drug development for cancer therapy, EGFR and its signaling components can be employed as targets. One of the therapy categories that targets TKs is tyrosine kinase inhibitors (TKIs- eg: gefitinib, erlotinib, and afatinib) [5,8]. Erlotinib (Tarceva®) from first-generation EGFR-TKIs has been approved by US FDA for the treatment of locally advanced or metastatic NSCLC in 2004 [9]. However, lung cancer treatment is often inefficient as a consequence of the drug resistance, reactions to treatment, drug-drug interactions or non-specific targeting of the anticancer drugs. This causes the need of new and more secure treatments. All the time, alternative medicine has been an intriguing field in medical research. Natural compounds show promise in lung cancer by the reason of the fact that having very few side effects [10]. The use of natural compounds including curcumin, capsaicin, eugenol, zerumbone, anethole, gambogic acid, diosgenin, thymoquinone alone and in combination with chemotherapy to inhibit disease progression have reviewed in several studies [11-13].

Zerumbone is an organic compound extracted from the rhizomes of Zingiber zerumbet Smith and



has been investigated for years [14,15]. Zerumbone is a sesquiterpene phytochemical that contains  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated carbonyl residues with three double bonds, one at the C-2 and the rest at the C-6 and C-9 positions. Recent studies have revealed that zerumbone has anti-cancer activity against many types of cancer (liver, cervix, ovary, lung etc.) by modulating several proteins to induce apoptosis and is considered as a promising therapeutic drug [15-18]. Despite potent anti-proliferative, anti-metastatic and pro-apoptotic properties against some types of cancer, exact molecular mechanism of zerumbone has not been fully understood [19].

The detection of specific cancer treatments is based on virtual techniques. Molecular docking is one of the best virtual screening techniques for targeting and processing multiple molecules participating the signaling pathway. In the present study, we aimed to analyze the activity of zerumbone as an anticancer agent targeting EGFR by molecular docking approach. Because it is considered that zerumbone may provide an alternative to erlotinib for cancer treatment. It is also aimed to evaluate the activity of zerumbone in comparison to curcumin which is a natural compound and has a potential with an anti-EGFR activity. So, the binding interactions of EGFR with zerumbone and curcumin were investigated by computer simulations such as molecular electrostatic potential analysis and molecular docking. Moreover, results were compared with the binding interactions of EGFR with erlotinib.

## MATERIAL AND METHOD

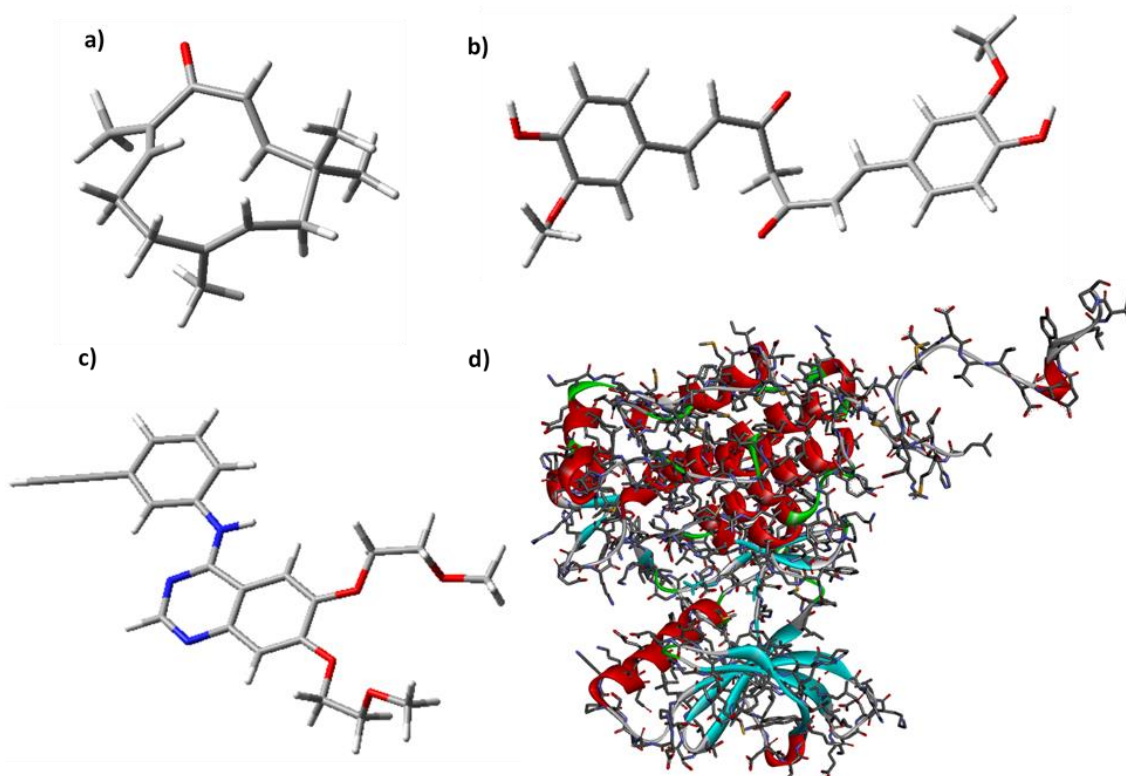
The initial geometries of zerumbone and curcumin were drawn by Gauss View 5.0 [20], then they were optimized with DFT (Density Functional Theory) method in Gaussian 09 [21] (B3LYP [22,23] with the 6-31G(D, P) basis set).

For the purpose of understanding how electrostatic interactions affect binding of EGFR with zerumbone and curcumin, molecular electrostatic potential (MEP) and the highest occupied molecular orbital -lowest unoccupied molecular orbital (HOMO-LUMO) analyses were achieved at B3LYP/6-31G(D, P) level [24,25]. In the light of MEP analysis, the binding modes of EGFR for zerumbone and curcumin were searched by molecular docking. Molecular docking is powerful tool to examine receptor-ligand interactions. The best binding conformations between the receptor and ligand can be demonstrated by molecular docking analysis, which calculates the best binding energy using the following equation:

$$\Delta G = \Delta G_{\text{vdW}} + \Delta G_{\text{Hbond}} + \Delta G_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{tor}} + \Delta G_{\text{desolv}}$$

where the energy terms are represented as follows: van der Waals term  $\Delta G_{\text{vdW}}$ , H-bonding term  $\Delta G_{\text{Hbond}}$ , the electrostatic term  $\Delta G_{\text{elec}}$ , torsional free energy term  $\Delta G_{\text{tor}}$  when the ligand transits from the unbound to the bound state, and the desolvation term  $\Delta G_{\text{desolv}}$ .

The inter-molecular interactions were calculated by selecting EGFR tyrosine kinase as receptor defined with Protein Data Bank (PDB) ID: 1M17 and zerumbone as ligand molecule (Figure 1). Later, curcumin having two tautomeric forms (keto and enol form) was chosen as ligand. In this stage, two forms were optimized at B3LYP/6-31G(D, P) level. Molecular docking analysis was performed with keto form having the lower energy obtained from optimization stage, as keto form possess has a lower energy of about 13 kcal/mol than enol form. Molecular docking studies were performed by AutoDockVina v.1.5.4 program [26]. First of all, in the arranging of the receptor and ligands MGL Tools v.1.5.4 have been used to convert into .pdbqt format [27]. Discover Studio Visualizer software was operated for visualization of interactions between the receptor and ligands [28]. Crystal data of the receptor was obtained from Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank website [29]. In order to validate this molecular docking studies, cocrystal ligand erlotinib was redocked to EGFR (PDB ID: 1M17).



**Figure 1.** Optimized structures of zerumbone (a), curcumin (b) and (c) erlotinib at B3LYP/6-31G(D, P) level and the structure of 1M17\* (d) (\*obtained from the RCSB Protein Data Bank website [29]).

## RESULT AND DISCUSSION

In the current study, the binding of zerumbone and curcumin to the tyrosine kinase domain in EGFR and inhibition of EGFR activity by molecular docking compared to that of erlotinib were discussed.

### Electronic Properties of Zerumbone and Curcumin: Molecular Electrostatic Potential and HOMO-LUMO Analyses

MEP and HOMO-LUMO analyses was used to evaluate electronic properties of zerumbone and curcumin. MEP is a common tool to clarify the reactive behavior (electrophilicity, nucleophilicity), the recognition of biological processes and H-bonding interactions [25]. HOMO defines as the outer orbital containing electrons tends to give them as an electron donor, whereas LUMO can accept electrons and the LUMO energy is directly associated with electron affinity [24].

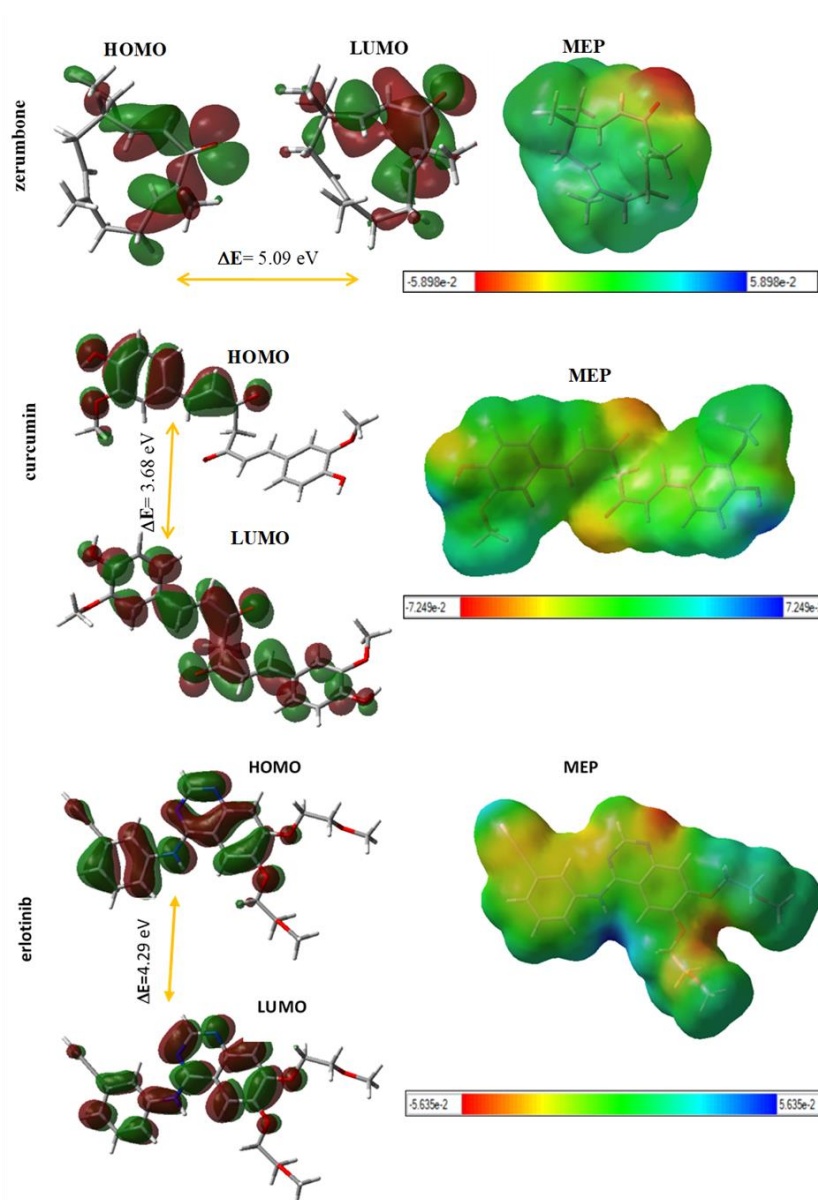
The oxygen atom of zerumbone has electron-rich site (corresponding to a red zone) with the highest negative potential which is in charge of the electrophilic attack, while the other parts of this molecule (green zone) have neutral areas, according to MEP diagram shown in Figure 2. While H atoms of phenolic hydroxyl in curcumin are responsible for nucleophilic attack which have the highest positive potential (blue zone), keto groups (C=O) of curcumin is in charge of electrophilic attack because of the highest negative potential.

The global reactivity parameters such as electronegativity ( $\chi$ ), chemical potential ( $\mu$ ), hardness ( $\eta$ ), electrophilicity index ( $\omega$ ), and softness ( $\sigma$ ) is computed by using Koopman's theorem [30]. While HOMO-LUMO distribution of zerumbone is the same trend, HOMO of curcumin is localized on the middle of the molecule and LUMO is distributed throughout the whole molecule. According to HOMO-LUMO analysis (Table 1), low electrophilicity index ( $\omega$ ) (low  $|\mu|$  and high  $\eta$  values) of zerumbone means that its nucleophilic behavior is well. On the contrary, curcumin shows good electrophilic character with high  $|\mu|$  and low  $\eta$  values.

**Table 1.** HOMO-LUMO energies (eV) and calculated global reactivity parameters of zerumbone, curcumin and erlotinib at B3LYP/6-31G(d,p) level.

Compound	LUMO	HOMO	$\Delta E$ (eV)	IP(eV)	EA(eV)	$\chi$ (eV)	$\eta$ (eV)	$\sigma$ (eV) <sup>-1</sup>	$\mu$ (eV)	$\omega$ (eV)
Zerumbone	-1.107	-6.194	5.087	6.194	1.107	3.650	2.544	0.197	-3.650	2.619
Curcumin	-1.942	-5.617	3.675	5.617	1.942	3.780	1.837	0.272	-3.780	3.887
Erlotinib	-1.137	-5.432	4.295	5.432	1.137	3.284	2.148	0.233	-3.284	2.512

$\Delta E$  ( $E_{\text{LUMO}}-E_{\text{HOMO}}$ ): Band gap, IP ( $-HOMO$ ): Ionization potential, EA ( $-LUMO$ ): Electron affinity,  $\chi$  ( $(IP+EA)/2$ ): Electronegativity,  $\eta$  ( $(IP-EA)/2$ ): Chemical hardness,  $\sigma$  ( $1/2\eta$ ): chemical softness,  $\mu$  ( $-(IP+EA)/2$ ): Chemical potential,  $\omega$  ( $\mu^2/2\eta$ ): Electrophilic index.

**Figure 2.** MEP and HOMO-LUMO drawing of zerumbone, curcumin and erlotinib.

## Molecular Docking Studies

Researches on finding new therapeutic agents in the treatment of cancer, which aims to inhibit excessive cell proliferation immediately and hinder the metastatic process, has always been a crucial issue. Cellular proteins or receptors have suggested as targets for anticancer drugs because of their roles in cancer cell survival and disease progression. Receptor tyrosine kinases (RTKs) regulate essential cellular processes such as cell proliferation, division and differentiation. EGFR is a member of the family of growth factor RTKs. Upon EGFR activation, several signaling transduction cascades like PI3K/Akt, Raf/MEK/Erk, and STAT pathways are then activated and lead to cell survival [31,32]. EGFR has been associated with a large number of epithelial tumors such as breast, lung, brain, prostate, and liver cancer [6]. It has become an important target in cancer therapy [33]. Due to overexpression of EGFR in NSCLC, targeting EGFR signaling is a well-established strategy for treatment of NSCLC.

Many small molecules have been designed and synthesized for EGFR inhibition such as gefitinib, erlotinib, and lapatinib (the first-generation EGFR inhibitors) [34]. Erlotinib inhibits the EGFR kinase through binding to the ATP binding site and a H-bond is formed with the NH backbone of Met769 at the hinge region of EGFR [35].

Recently, researches on new molecules that inhibit this receptor are turning to natural substances. Zerumbone and curcumin as natural compounds appear to be related to EGFR inhibition as demonstrated in previous studies [33,36–38].

The molecular docking studies play a critical role in new drug discovery, determining the exact binding target and the molecular events that may happen between the drug and the target. This method has been successfully used in many studies [6,8,39]. Docking studies of zerumbone and curcumin were conducted on EGFR kinase to specify if it interacts with EGFR in resembling case to erlotinib.

The binding energy of zerumbone is -7.6 kcal/mol (Table 2) and constructs one strong inter-molecular H-bond between NH in residue MET769 of the EGFR and =O of the zerumbone molecule. This N–H···O type H-bond between the zerumbone and the EGFR is reasonably strong with the value of 1.80 Å (Table 3). Additionally, the carbon H-bond occurs between CH atom in residue LEU768 and =O atom of the zerumbone. Moreover, there are three alkyl interactions between electron group of alkyl group (ALA719, VAL702 and LEU820) and carbon atom on the opposite side of oxygen as shown in Figure 3. The other interactions are of the van der Waals type (shown light green). These results pointed out that both strong H-bond and other interactions played an important role in the binding of zerumbone with EGFR.

**Table 2.** The binding affinity and RMSD values of best poses of **zerumbone**, **curcumin** and **erlotinib** docked into the receptor **1M17**.

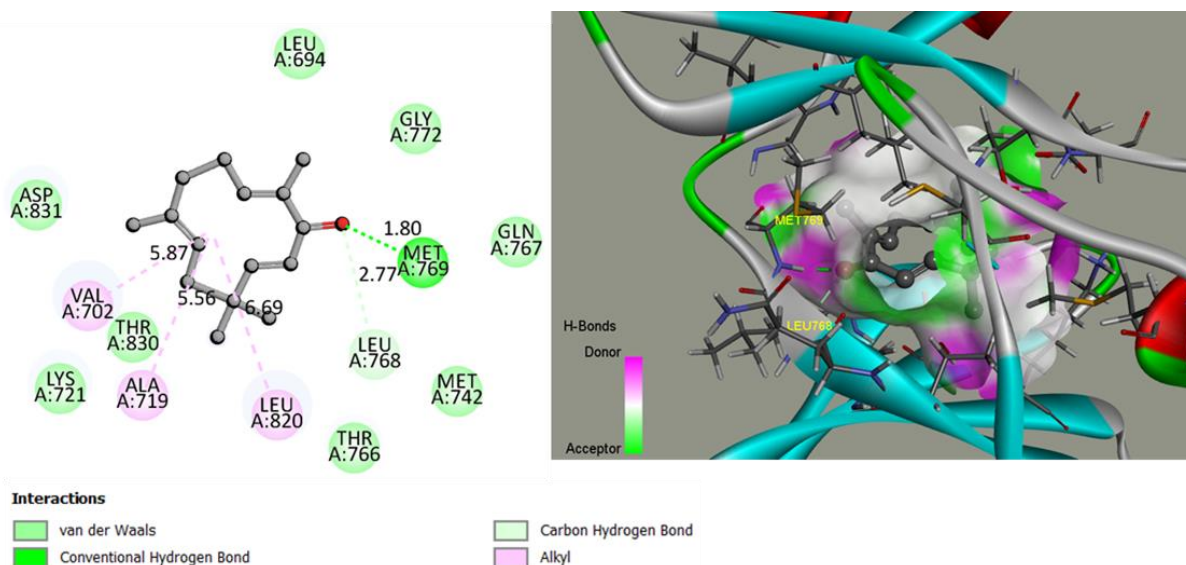
Best Mode	Affinity (kcal/mol)	Distance from best mode (Å)	
		RMSD l.b.	RMSD u.b.
<b>zerumbone</b>	-7.6	0.000	0.000
<b>curcumin</b>	-8.0	0.000	0.000
<b>erlotinib</b>	-7.3	0.000	0.000

Curcumin containing the functional groups like a 3,5- dione group, methoxyl and hydroxyl groups interact with EGFR through these groups. Curcumin has two H-bonds. One of them is between C=O of curcumin and the backbone NH of MET769, the other is between the phenolic OH group and COO<sup>-</sup> oxygen of ASP831 (Figure 4). H-bond between C=O and the backbone NH of MET769 is stronger than the bond between the phenolic OH group and COO<sup>-</sup> oxygen of ASP831, their values are 1.87 Å and 2.84 Å, respectively. In addition, the carbon hydrogen bond exists between COO<sup>-</sup> oxygen in GLU738 and methyl carbon in methoxy group of ligand. The interaction of  $\pi$ -electron cloud over an aromatic group and electron cloud of alkyl groups (ALA719, VAL702 and LYS721) represents to  $\pi$ -alkyl interactions.

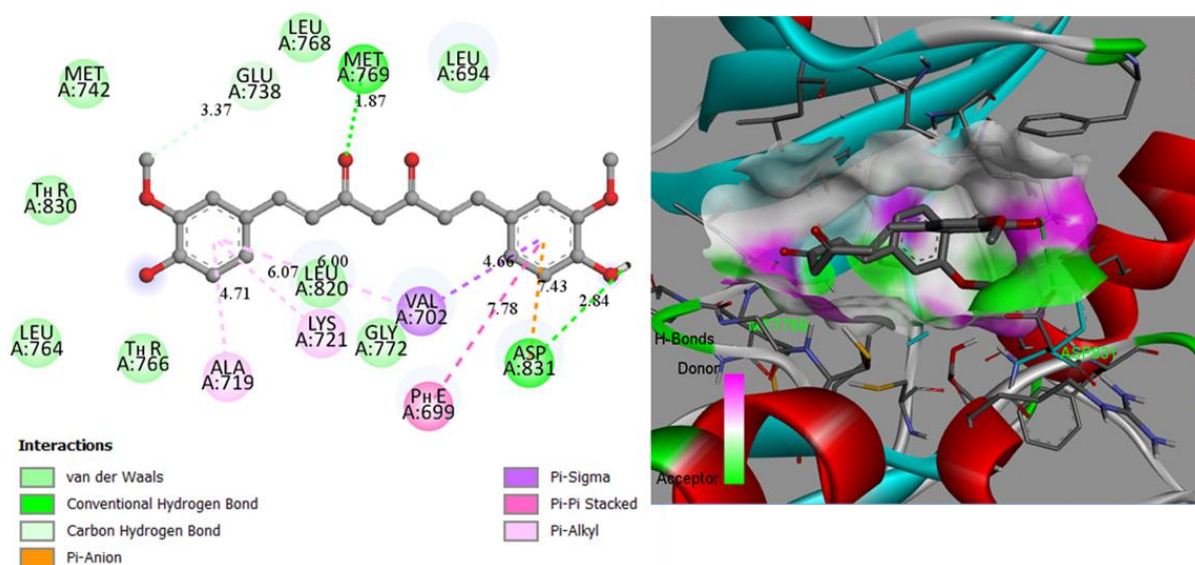
Moreover,  $\pi$ - $\pi$  stacking is between phenyl ring of PHE699 and phenyl ring bonded methoxy of ligand (Table 3). The binding energy of curcumin is -8.0 kcal/mol (Table 2).

**Table 3.** Interactions, their species and distances between **zerumbone**, **curcumin** and **erlotinib** and the **1M17**.

Residue	Ligand group	Distance (Å)	Interaction
<b>zerumbone</b>			
NH atom in MET769	=O atom	1.80	Conventional hydrogen bond
CH atom in LEU768	=O atom	2.77	Carbon hydrogen bond
alkyl in ALA719	carbon	5.56	Alkyl
alkyl in VAL702	carbon	5.87	Alkyl
alkyl in LEU820	carbon	6.69	Alkyl
<b>curcumin</b>			
NH atom in MET769	=O atom	1.87	Conventional hydrogen bond
COO <sup>-</sup> oxygen in ASP831	phenolic OH	2.84	Conventional hydrogen bond
COO <sup>-</sup> oxygen in GLU738	methyl carbon in methoxy group	3.37	Carbon hydrogen bond
Methyl carbon in VAL702	pi in phenyl ring linked methoxy	4.66	Pi-Sigma
Alkyl in ALA719	pi in phenyl ring linked methoxy	4.71	Pi-Alkyl
Alkyl in VAL702	pi in phenyl ring linked methoxy	6.00	Pi-Alkyl
Alkyl in LYS721	pi in phenyl ring linked methoxy	6.07	Pi-Alkyl
COO <sup>-</sup> oxygen in ASP831	pi in phenyl ring linked methoxy	7.43	Pi-Anion
pi in phenyl ring in PHE699	pi in phenyl ring linked methoxy	7.78	Pi-Pi Stacked
<b>erlotinib</b>			
NH atom in MET769	- O atom	1.91	Conventional hydrogen bond
NH atom in LYS721	N atom	2.11	Conventional hydrogen bond
pi in phenyl ring in PHE699	pi in phenyl ring	4.47	Pi-Pi Stacked
Alkyl in VAL702	pi in quinazoline ring	4.83	Pi-Alkyl
Alkyl in LYS721	pi in quinazoline ring	4.86	Pi-Alkyl
Alkyl in VAL702	pi in quinazoline ring	5.16	Pi-Alkyl
COO <sup>-</sup> oxygen in ASP831	pi in quinazoline ring	6.13	Pi-Anion
COO <sup>-</sup> oxygen in ASP831	pi in ethynylbenzene	6.28	Pi-Anion
alkyl in LEU820	pi in quinazoline ring	7.05	Pi-Alkyl



**Figure 3.** The interactions of **zerumbone** docked into the macromolecule **1M17** (left) and amino acid residue involved in hydrogen bond (green dotted line) (right).



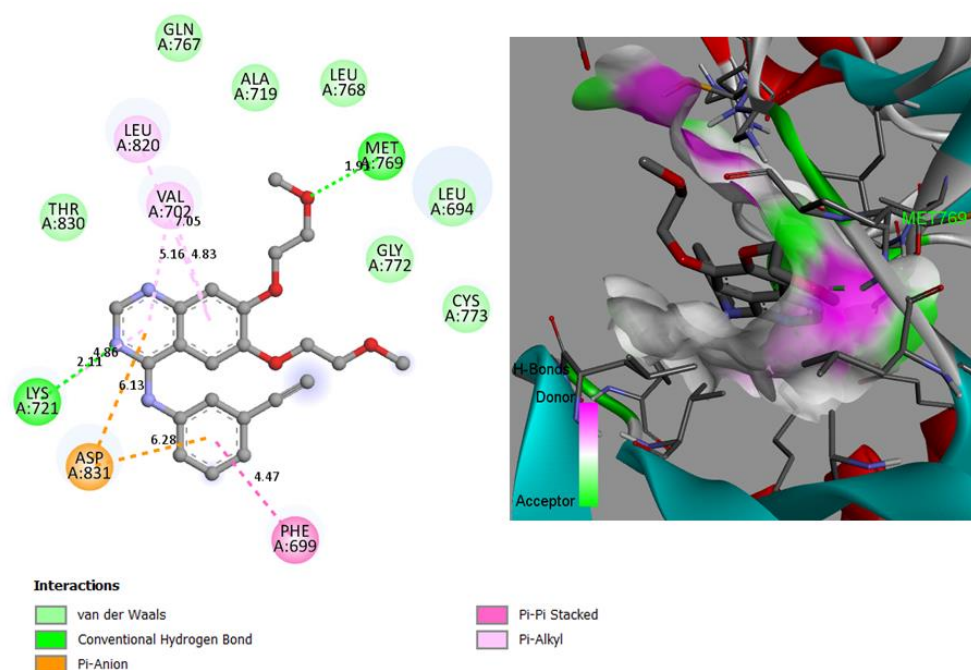
**Figure 4.** The interactions of **curcumin** docked into the macromolecule **1M17** (left) and amino acid residue involved in hydrogen bond (green dotted lines) (right).

The functional groups like ethynyl-phenyl and methoxy-ethoxy linked quinazoline in erlotinib interact with EGFR, in which two of the interactions are conventional hydrogen bonds. The others are  $\pi$ -alkyl,  $\pi$ - $\pi$  stacking and  $\pi$ -anion interactions given in Table 3 and Figure 5.

Our results demonstrated that the binding energies of zerumbone and curcumin are very close to each other. Also their binding energies compared to that of erlotinib (-7.3 kcal/mol in this study (-7.54 kcal/mol [40]), there is only 0.3 and 0.7 kcal/mol difference between them, respectively. While the zerumbone shows stronger H-bonding (1.80 Å), curcumin has two type H-bond, which the stronger one (1.87 Å) is the same as the interaction in zerumbone and the other one is weaker (2.84 Å). Both ligands interact with EGFR similar to erlotinib which has H-bond on MET769. H-bonds on MET769 of two



ligands are stronger than that of erlotinib (1.91 Å in this study) (2.70 Å [40]). Based on these values, it can be mentioned that zerumbone, curcumin and erlotinib bind strongly to the receptor.



**Figure 5.** The interactions of **erlotinib** docked into the macromolecule **1M17** (left) and amino acid residue involved in hydrogen bond (green dotted lines) (right).

Band gap energy ( $\Delta E$ ) order is curcumin (3.68 eV) < erlotinib (4.29 eV) < zerumbone (5.09 eV) according to this study. The larger the band gap energy means the harder and more stable and less reactive the molecule. According to  $\Delta E$  order, zerumbone is the most stable in binding to EGFR as a consequence of the highest energy gap. In this case, erlotinib containing the functional groups like methoxy-ethoxy bonded quinazoline is more reactive than zerumbone with the lower band gap, which is due to possess the large number of groups to interact with.

In conclusion, small molecules targeting EGFR have become prominent in cancer treatment, especially NSCLC. Natural products as anti-cancer compounds can be counted among the most important small molecule inhibitors. This study revealed that zerumbone has the potential as tyrosine kinase inhibitor that target EGFR due to the strong H-bond interactions and more stability. The oxygen atom of carboxyl in zerumbone being responsible for the electrophilic attack makes H-bond with NH atom in MET769, as did in curcumin. The oxygen of phenolic OH in curcumin resonates with the phenyl ring and becomes more positive (responsible for nucleophilic attack) and it makes H-bond with COO-oxygen of ASP831. Both ligands have same type H-bonds between the C=O group and the backbone NH of MET769, which are stronger than that of erlotinib. Based on this *in silico* results using docking studies, we can say that zerumbone may be effective in lung cancer treatment like erlotinib. However, *in vitro* and *in vivo* studies are necessary to understand the molecular mechanism of anti-cancer effect of zerumbone and also investigate its use in cancer treatment by targeting EGFR and its signaling components.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: D.Y., A.K.; Design: D.Y., B.B., A.K.; Control: D.Y., A.K.; Sources: D.Y., B.B., A.K.; Materials: - ; Data Collection and/or Processing: A.K.; Analysis and/or Interpretation: D.Y., B.B., A.K.;

Literature Review: D.Y., B.B., A.K.; Manuscript Writing: D.Y., B.B., A.K.; Critical Review: D.Y., B.B., A.K., 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. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424. [\[CrossRef\]](#)
2. Howlander, N., Noone, A.M., Krapcho, M., Miller, D., Brest, A., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Mariotto, A., Lewis, D.R., Chen, H.S., Feuer, E.J. and Cronin, K.A. (2020). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2017. National Cancer Institute, Bethesda, MD. Erişim adresi: [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2017/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/) Accessed date: 13.05.2022
3. Ettinger, D.S., Akerley, W., Bepler, G., Blum, M.G., Chang, A., Cheney, R.T., Chirieac, L.R., D'Amico, T.A., Demmy, T.L., Ganti, A.K.P., Govindan, R., Grannis, F.W., Jahan, T., Jahanzeb, M., Johnson, D.H., Kessinger, A., Komaki, R., Kong, F.M., Kris, M.G., Krug, L.M., Le, Q., Lennes, I.T., Martins, R., O'Malley, J., Osarogiagbon, R.U., Otterson, G.A., Patel, J.D., Pisters, K.M., Reckamp, K., Riely, G.J., Rohren, E., Simon, G.R., Swanson, S.J., Wood, D.E., Yang, S.C. (2010). Non-small cell lung cancer: Clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 8(7), 740-801. [\[CrossRef\]](#)
4. Li, S., Liu, Z., Zhu, F., Fan, X., Wu, X., Zhao, H., Jiang, L. (2013). Curcumin lowers erlotinib resistance in non-small cell lung carcinoma cells with mutated EGF receptor. *Oncology Research*, 21(3), 137-144. [\[CrossRef\]](#)
5. Liu, X., Wang, P., Zhang, C., Ma, Z. (2017). Epidermal growth factor receptor (EGFR): A rising star in the era of precision medicine of lung cancer. *Oncotarget*, 8(30), 50209-50220. [\[CrossRef\]](#)
6. Hossain, S.L., Mathews, M., Bhyranalyar Nagarajappa, V.S., Kumar, B.K., Veerappa Yelamaggad, C.V., Singh, C.R. (2022). Antiproliferative, apoptosis-inducing activity and molecular docking studies of sydnone compounds. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 18(3), 681-690. [\[CrossRef\]](#)
7. Tajuddin, W.N.B.W.M., Lajis, N.H., Abas, F., Othman, I., Naidu, R. (2019). Mechanistic understanding of curcumin's therapeutic effects in lung cancer. *Nutrients*, 11(12), 2989. [\[CrossRef\]](#)
8. Bhatia, P., Sharma, V., Alam, O., Manaihiya, A., Alam, P., Kahksha, Alam, M.T., Imran, M. (2020). Novel quinazoline-based EGFR kinase inhibitors: A review focussing on SAR and molecular docking studies (2015-2019). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 204, 112640. [\[CrossRef\]](#)
9. Smith, J. (2005). Erlotinib: Small-molecule targeted therapy in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Clinical Therapeutics*, 27(10), 1513-1534. [\[CrossRef\]](#)
10. Al-Yozbaki, M., Wilkin, P.J., Gupta, G.K., Wilson, C.M. (2021). Therapeutic potential of natural compounds in lung cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 28(39), 7988-8002. [\[CrossRef\]](#)
11. Batra, H., Pawar, S., Bahl, D. (2019). Curcumin in combination with anti-cancer drugs: A nanomedicine review. *Pharmacological Research*, 139, 91-105. [\[CrossRef\]](#)
12. Nobari, S., Najafi, R., Mahdavezhad, A., Jalali, A., Amini, R. (2022). The combination of zerumbone with 5-fluorouracil for sensitizing colorectal cancer-associated fibroblasts to treatment. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022, 9369328. [\[CrossRef\]](#)
13. Aggarwal, B.B., Kunnumakkara, A.B., Harlkumar, K.B., Tharakan, S. T., Sung, B., Anand, P. (2008). Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. *Planta Medica*, 74(13), 1560-1569. [\[CrossRef\]](#)
14. Hseu, Y.C., Huang, Y.C., Korivi, M., Wu, J.J., Way, T.D., Ou, T.T., Chiu, L.W., Lee, C.C., Lin, M.L., Yang, H.L. (2015). Zerumbone attenuates TGF- $\beta$ 1-mediated epithelial-mesenchymal transition via upregulated E-cadherin expression and downregulated Smad2 signalling pathways in non-small cell lung cancer (A549) cells. *Journal of Functional Foods*, 18(A), 58-72. [\[CrossRef\]](#)



15. Hu, Z., Zeng, Q., Zhang, B., Liu, H., Wang, W. (2014). Promotion of p53 expression and reactive oxidative stress production is involved in zerumbone-induced cisplatin sensitization of non-small cell lung cancer cells. *Biochimie*, 107(B), 257-262. [\[CrossRef\]](#)
16. Abdelwahab, S.I., Abdul, A.B., Zain, Z.N.M., Hadi, A.H.A. (2012). Zerumbone inhibits interleukin-6 and induces apoptosis and cell cycle arrest in ovarian and cervical cancer cells. *International Immunopharmacology*, 12(4), 594-602. [\[CrossRef\]](#)
17. Muhammad Nadzri, N., Abdul, A.B., Sukari, M.A., Abdelwahab, S.I., Eid, E.E.M., Mohan, S., Kamalidehghan, B., Anasamy, T., Ng, K.B., Syam, S., Arbab, I.A., Rahman, H.S., Ali, H.M. (2013). Inclusion complex of zerumbone with hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin induces apoptosis in liver hepatocellular HepG2 Cells via caspase 8/BID cleavage switch and modulating Bcl2/Bax ratio. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 810632. [\[CrossRef\]](#)
18. Haque, M.A., Jantan, I., Arshad, L., Bukhari, S.N.A. (2017). Exploring the immunomodulatory and anticancer properties of zerumbone. *Food and Function*, 8(10), 3410-3431. [\[CrossRef\]](#)
19. Barathan, M., Vellasamy, K.M., Ibrahim, Z.A., Mariappan, V., Hoong, S.M., Vadivelu, J. (2021). Zerumbone mediates apoptosis and induces secretion of proinflammatory cytokines in breast carcinoma cell culture. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 24(11), 1538-1545. [\[CrossRef\]](#)
20. Dennington, R., Keith, T., Millam, J. (2009). GaussView, Version 5, Semichem Inc., Shawnee Mission, KS.
21. Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H.P., Izmaylov, A.F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J.L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery Jr., J.A., Peralta, J.E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J.J., Brothers, E., Kudin, K.N., Staroverov, V.N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J.C., Iyengar, S.S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J.M., Klene, M., Knox, J.E., Cross, J.B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R.E., Yazyev, O., Austin, A.J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J.W., Martin, R.L., Morokuma, K., Zakrzewski, V.G., Voth, G.A., Salvador, P., Dannenberg, J.J., Dapprich, S., Daniels, A.D., Farkas, O., Foresman, J.B., Ortiz, J.V., Cioslowski, J., Fox, D.J. (2010) Gaussian 09, Revision B.01. Gaussian Inc., Wallingford.
22. Becke, A.D. (1988). Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical Review A*, 38(6), 3098. [\[CrossRef\]](#)
23. Lee, C., Yang, W., Parr, G.R. (1988). Development of the Colic-Salvetti correlation-energy into a functional of the electron density. *American Physical Society*, 37(2), 785-789. [\[CrossRef\]](#)
24. Panicker, C.Y., Varghese, H.T., Manjula, P.S., Sarojini, B.K., Narayana, B., War, J.A., Srivastava, S.K., Van Alsenoy, C., Al-Saadi, A.A. (2015). FT-IR, HOMO-LUMO, NBO, MEP analysis and molecular docking study of 3-Methyl-4-[(E)-[4-(methylsulfonyl)-benzylidene]amino] 1H-1,2,4-triazole-5(4H)-thione. *Spectrochimica Acta-Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 151, 198-207. [\[CrossRef\]](#)
25. Karayel, A. (2021). Molecular stabilities, conformational analyses and molecular docking studies of benzimidazole derivatives bearing 1,2,4-triazole as EGFR inhibitors. *Structural Chemistry*, 32(3), 1247-1259. [\[CrossRef\]](#)
26. Trott, O., Olson, A.J. (2009). 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. [\[CrossRef\]](#)
27. Sanner, M.F. (1999). Python: A programming Language for software integration and development. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 17(1), 57-61.
28. Chang, Y.M., Chen, C.K.M., Ko, T.P., Chang-Chien, M.W., Wang, A.H.J. (2013). Structural analysis of the antibiotic-recognition mechanism of MarR proteins. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(6), 1138-1149. [\[CrossRef\]](#)
29. Stamos, J., Sliwkowski, M.X., Eigenbrot, C. (2002). Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 46265-46272. [\[CrossRef\]](#)
30. Gázquez, J.L. (2008). Perspectives on the density functional theory of chemical reactivity. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 52(1), 3-10.
31. Ye, M.X., Li, Y., Yin, H., Zhang, J. (2012). Curcumin: Updated molecular mechanisms and intervention targets in human lung cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3959-3978. [\[CrossRef\]](#)
32. Liang, Y., Zhao, J., Zou, H., Zhang, J., Zhang, T. (2021). In vitro and in silico evaluation of EGFR targeting activities of curcumin and its derivatives. *Food and Function*, 12(21), 10667-10675. [\[CrossRef\]](#)

33. Songsiang, U., Pitchuanom, S., Boonyarat, C., Hahnvajanawong, C., Yenjai, C. (2010). Cytotoxicity against cholangiocarcinoma cell lines of zerumbone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(9), 3794-3802. [\[CrossRef\]](#)
34. Hossam, M., Lasheen, D.S., Abouzid, K.A.M. (2016). Covalent EGFR Inhibitors: Binding mechanisms, synthetic approaches, and clinical profiles. *Archiv der Pharmazie*, 349(8), 573-593. [\[CrossRef\]](#)
35. Sufi, S.A., Adigopula, L.N., Syed, S.B., Mukherjee, V., Coumar, M.S., Rao, H.S.P., Rajagopalan, R. (2017). In-silico and in-vitro anti-cancer potential of a curcumin analogue (1E, 6E)-1, 7-di (1H-indol-3-yl) hepta-1, 6-diene-3,5-dione. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 85, 389-398. [\[CrossRef\]](#)
36. Kim, S., Kil, W.H., Lee, J., Oh, S.J., Han, J., Jeon, M., Jung, T., Lee, S.K., Bae, S.Y., Lee, H.C., Lee, J.H., Yi, H.W., Kim, S.W., Nam, S.J., Lee, J.E. (2014). Zerumbone suppresses EGF-induced CD44 expression through the inhibition of STAT3 in breast cancer cells. *Oncology Reports*, 32(6), 2666-2672. [\[CrossRef\]](#)
37. Shafiee, M., Mohamadzade, E., ShahidSales, S., Khakpouri, S., Maftouh, M., Parizadeh, S.A., Hasanian, S. M., Avan, A. (2017). Current status and perspectives regarding the therapeutic potential of targeting EGFR pathway by curcumin in lung cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 23(13), 2002-2008. [\[CrossRef\]](#)
38. Zhang, L., Tao, X., Fu, Q., Ge, C., Li, R., Li, Z., Zhu, Y., Tian, H., Li, Q., Liu, M., Hu, H., Zeng, B., Lin, Z., Li, C., Luo, R., Song, X. (2019). Curcumin inhibits cell proliferation and migration in NSCLC through a synergistic effect on the TLR4/MyD88 and EGFR pathways. *Oncology Reports*, 42(5), 1843-1855. [\[CrossRef\]](#)
39. Nand, M., Maiti, P., Pant, R., Kumari, M., Chandra, S., Pande, V. (2016). Virtual screening of natural compounds as inhibitors of EGFR 696-1022 T790M associated with non-small cell lung cancer. *Bioinformatics*, 12(6), 311-317 [\[CrossRef\]](#)
40. Ahmad Mir, S., Meher, R.K., Baitharu, I., Nayak, B. (2022). Molecular dynamic simulation, free binding energy calculation of Thiazolo-[2,3-*b*]quinazolinone derivatives against EGFR-TKD and their anticancer activity. *Results in Chemistry*, 4, 100418. [\[CrossRef\]](#)



## PROPOLİS EKSTRAKTI BİTKİSEL YAĞLARIN OKSİDATİF STABİLİTESİNİ İYİLEŞTİRMEK İÇİN DOĞAL BİR ANTIOKSİDAN OLARAK ÖNERİLEBİLİR

*PROPOLIS EXTRACT COULD BE RECOMMENDED AS A NATURAL ANTIOXIDANT TO IMPROVE VEGETABLE OIL OXIDATIVE STABILITY*

Ümit ERDOĞAN<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Gül ve Aromatik Bitkiler Uygulama ve Araştırma Merkezi,  
32260, Isparta, Türkiye

### ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmada, propolisin ultrasonik destekli etanolik ekstraktının, toplam fenolik içeriği, bireysel fenolik bileşenleri ve toplam antioksidan kapasitesi ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Çalışmamızın diğer bir amacı da propolis ekstraktınının, zeytinyağı lipid oksidasyonu üzerindeki etkilerini sentetik antioksidanlara (BHA, BHT) kıyasla hızlandırılmış termal koşullar altında yapılan testlerle ortaya koymaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Propolis ekstraktınının toplam antioksidan kapasitesini CUPRAC metoduna göre belirledik. Diğer taraftan propolis ekstraktınının polifenolik içeriği Folin testiyle belirlendi. Propolisin fenolik bileşiklerin tanımlanması ise ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) kullanılarak gerçekleştirildi. Hızlandırılmış depolama koşulları altında, propolisin sızma zeytinyağının oksidatif stabilitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi shall oven testine göre analiz edildi.

**Sonuç ve Tartışma:** Sonuçlar propolisin fenolik bileşenler açısından zengin olduğunu ortaya koydu. CUPRAC tahliline göre propolis ekstraktınının toplam antioksidan kapasitesi  $2.013 \pm 0.03$  mmol TR/g-propolis ekstraktı olarak hesaplandı. Propolis ekstraktınının toplam fenolik içeriği  $1.67 \pm 0.008$  mmol TR/g-propolis ekstraktı olarak hesaplandı. Dahil edilen propolis ekstraktlı yağlar, daha düşük peroksit değeri ve kısmen azaltılmış tokoferol içeriği de dahil olmak üzere çok daha iyi kimyasal stabilite sergiledi. Veriler, propolis ekstraktınının zeytinyağının oksidasyonunu geciktirmede BHA ve BHT gibi sentetik antioksidanlara kıyasla daha etkili olduğunu gösterdi.

**Anahtar Kelimeler:** CUPRAC metodu, folin testi, lipid oksidasyonu, propolis, oksidatif stabilite

\* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Ümit Erdoğan  
e-posta / e-mail: umiterdogan@isparta.edu.tr, Tel. / Phone: +905327934329

## ABSTRACT

**Objective:** *In this study, the total phenolic content, individual phenolic components, and total antioxidant capacity of the ultrasonically assisted ethanolic extract of propolis were investigated in detail. Another aim of our study was to reveal the effects of propolis extracts on olive oil lipid oxidation compared to synthetic antioxidants (BHA, BHT) with tests performed under accelerated thermal conditions.*

**Material and Method:** *We determined the total antioxidant capacity of propolis extract by CUPRAC assay. On the other hand, the polyphenolic content of propolis extract was determined by the Folin assay. Identification of phenolic compounds of propolis was performed using reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The effect of propolis on the oxidative stability of extra virgin olive oil under accelerated storage conditions was studied using the Shall oven test.*

**Result and Discussion:** *The results revealed that propolis is rich in phenolic components. According to the CUPRAC assay, the total antioxidant capacity of propolis extract was calculated to be  $2.013 \pm 0.03$  mmol TR/g-propolis extract. The total phenolic content of the propolis extract was calculated to be  $1.67 \pm 0.008$  mmol TR/ g-propolis extract. The oils with propolis extract incorporated exhibited much better chemical stability, including lower peroxide value and partly decreased tocopherols content. Data showed that propolis extract was more effective in delaying the oxidation of olive oil compared to synthetic antioxidants such as BHA and BHT.*

**Keywords:** *CUPRAC assay, folin test, lipid oxidation, propolis, oxidative stability*

## GİRİŞ

Propolis, ağaçların kozalak ve kabuklarından, bitki tomurcuklarından ve sürgünlerinden arılar tarafından toplanan doğal bir üründür. Propolisin içeriği toplandığı bölgeye ve mevsime göre değişmektedir. Propolisin, güçlü antimikrobiyal [1], antiviral, antiinflamatuvar [2], antioksidan [3], rejeneratif, antikanser, antimitojenik ve karsinostatik etkileri vardır [4], bileşiminde yağlar, polen, özel reçine ve mumsu maddelerin karışımı vardır [5]. Propolis genel olarak polifenoller (flavonoidler, fenolik asitler ve esterleri), terpenoidler, steroidler ve amino asitler gibi çeşitli kimyasal bileşikler içerir [6]. Propolisin tüm biyoaktif bileşenleri, farmakolojik aktivitesinden sorumludur. Propolis, biyolojik ve farmakolojik aktiviteleri nedeniyle Avrupa'dan Doğu Asya'ya kadar geleneksel tıp, kozmetik ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır [7,8]. Propolisin yüksek tıbbi potansiyeli ve terapötik etkinliği, geleneksel tıp uygulamalarında yaygın olarak kullanılmasına katkıda bulunmuştur. Propolis yüksek miktarda fenolik bileşen içerdiğinden önemli antioksidan aktivite gösterir. Bu nedenle, gıda uygulamaları için sentetik antioksidanlardan daha güvenli olan doğal antioksidanlara artan bir ilgi vardır ve tüketici tercihlerinde doğal antioksidanlara artan bir ilgi vardır [9].

Lipid oksidasyonu, lipid açısından zengin gıda maddelerinde çeşitli fiziksel ve kimyasal değişikliklere neden olan çeşitli reaksiyonları içeren son derece çok yönlü bir süreçtir [10]. Yemeklik yağların işlenmesinden depolanmasına kadar geçen süreçte peroksitler, aldehitler, ketonlar ve lipid oksidasyonunu temsil eden diğer küçük moleküller gibi bileşikler oluşur. Lipid oksidasyonu sırasında oluşan bu bileşiklerin çoğu, lezzet, doku, besin değeri, koku ve renk gibi gıda kalite parametrelerini etkiler. Ayrıca bu oksitleyici ajanların bazıları insan sağlığı üzerinde toksik etkilere sahiptir [11]. Lipidlerin depolama stabilitesini arttırmak için sentetik ve doğal antioksidanlar kullanılmaktadır. Bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bitkisel yağ endüstrisinde en yaygın kullanılan sentetik antioksidanlardır [12]. Gıdalarda en yaygın olarak BHA, BHT, propil gallat (PG) ve tertbutilhidrokinon (TBHQ) gibi sentetik antioksidanlar kullanılsa da, bazı raporlar, BHA ve BHT gibi bazı sentetik antioksidanların bazı hayvanlarda yüksek seviyelerde zayıf kanserojen etkilere sahip olabileceğini göstermiştir [13]. Ayrıca "BHT'nin insan vücudunda kanserojen olabilecek diğer maddelere dönüşebileceği" endişesi de var. Örneğin, BHT'nin bir dönüşüm ürününün (hidroperoksit formu), hücreden hücreye gönderilen kimyasal sinyalleri bozduğu gösterilmiştir [14]. Bu nedenle, hükümet yetkilileri ve tüketiciler, gıdaların güvenliği ve sentetik katkı maddelerinin potansiyel sağlık etkileri konusunda endişe duymaktadır. Şu andaki araştırmalar, BHA ve BHT gibi sentetik katkı maddelerinin, farklı yemeklik yağlarda daha fazla antioksidan aktiviteye ve stabiliteye sahip doğal

maddelerle değiştirilmesine ve tüketicilerin güvenlik konusundaki artan ilgisini karşılamaya yöneliktir.

Bu çalışmada, ultrasonik destekli etanolik propolis ekstraktının, fenolik bileşenleri ve toplam antioksidan kapasitesi ayrıntılı olarak tartışılmıştır. Bu amaçla, propolis ekstraktının toplam antioksidan kapasitesini bakır iyonlarının ( $\text{Cu}^{2+}$ ) azaltıcı antioksidan kapasiteye (CUPRAC) göre belirledik. Çalışmamızın diğer bir amacı da propolis ekstraktlarının sızma zeytinyağı lipid oksidasyonu üzerindeki etkilerini sentetik antioksidanlara (BHA, BHT) kıyasla hızlandırılmış termal koşullar altında yapılan testlerle ortaya koymaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Kimyasallar

Bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bakır(II) klorür dihidrat ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), Neocuproine (Nc:  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2$ ), 2,2'-Bipiridin ( $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2$ ), DL- $\alpha$ -Tokoferol, Troloks (TR), Folin – Ciocalteu fenol reaktifi ve Sodyum potasyum tartarat tetrahidrat ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) Sigma Chemical Co.'dan (St. Louis, MO, ABD) satın alındı. Mutlak etanol (EtOH, %99), ISOLAB Laborgeräte GmbH (Eschau, ALMANYA)'den satın alındı. Amonyum asetat ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ ), sodyum tiyosülfat pentahidrat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), sodyum hidroksit (NaOH), bakır (II) sülfat pentahidrat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), demir(III) klorür heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), Merck'ten (Darmstadt, Almanya) satın alındı. Kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıktaydı ve Sigma-Aldrich veya Merck'ten elde edildi.

### Ultrason Destekli Ekstraksiyon (UDE)

Türkiye'nin Isparta ili Eğirdir-Sorkuncak Köyü'nden (uydu konum koordinatları;  $38^\circ 1' 25.5288''$  Kuzey ve  $30^\circ 52' 22.3032''$  Doğu) toplanan propolis örnekleri, işlenene kadar güneşten uzakta gölgede kurutuldu. Nemden arındırılmış propolis örnekleri ekstraksiyondan önce kahve değirmeni (Sinbo SCM 2934-Türkiye) ile öğütülerek hazırlandı. Propolisin ultrasonik destekli etanolik ekstraksiyonu Zhang ve ark. (2009) tarafından önerilen yöntemine göre gerçekleştirildi [15]. 10 g öğütülmüş propolis kapalı bir şişede 100 mL %96'lık etanol ortamında ekstraksiyona tabi tutuldu. Ekstraksiyon için ultrasonik banyo sistemi (Power sonic 180, 40 kHz frekans ve maksimum 150 W, iç ölçü: 300 mm  $\times$  150 mm  $\times$  100 mm) kullanıldı. Ultrasonik ekstraksiyon, aşağıdaki deneysel koşullar altında gerçekleştirildi: sıcaklık:  $50^\circ\text{C}$ ; zaman: 45 dakika; katı/çözücü oranı: 1:10 (w/v) ve maksimum ultrason gücü: 40 kHz ve 150 W güç. Toplanan ekstraktlar Whatman No: 1 filtre kağıdından süzüldü ve çözücüler döner bir buharlaştırıcı (IKA RV 10 digital, IKA, Almanya) ile  $55^\circ\text{C}$ 'de vakum altında buharlaştırılarak uzaklaştırıldı. Ekstraksiyon prosedürü paralel olarak üç kez gerçekleştirildi. Ekstraksiyon verimi aşağıdaki eşitlik (1) kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ Verim} = (\text{Ekstrakt ağırlığı} / \text{kuru örnek ağırlığı}) \times 100 \quad (1)$$

### Çözeltilerin Hazırlanması

10mM  $\text{CuCl}_2$  çözeltisi, 0.4262 g  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'nun az miktarda distile suda çözünmesi ve distile su ile 250 ml'ye seyreltilmesiyle hazırlandı. 1.0 M amonyum asetat tamponu (pH= 7.0), 19.27 g  $\text{NH}_4\text{Ac}$ 'nin az miktarda distile su içinde çözünmesi ve 250 mL'ye seyreltilmesiyle hazırlandı. 7.5mM Neocuproin (Nc) çözeltisi, 0.078 g Nc' nin %96 etanol içinde çözünmesi ve etanol ile 50 ml'ye seyreltilmesiyle günlük olarak hazırlandı. %0.2'lik  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi; 0.2 g Demir(III) klorür heksahidrat etanolde çözünmesi ve %95'lik etanolle 100 mL'ye seyreltilmesiyle hazırlandı. % 0.07'lik 2,2'-bipiridin çözeltisi; 70 mg 2,2'-Bipiridin'in %95'lik etanol ortamında çözünmesi ve etanol ile 100 ml'ye seyreltilmesiyle hazırlandı. Toplam fenoliklerin Folin analizinde kullanılan çözeltiler ise şu şekilde hazırlandı. Lowry A: 0.1 M NaOH içinde % 2 lik sodyum karbonat çözeltisi, Lowry B: % 1'lik sodyum potasyum tartarat tetrahidrat çözeltisinde % 0.5  $\text{CuSO}_4$  sulu çözeltisi, Lowry C: Karışım olarak taze hazırlanmış (50 ml Lowry A + 1 ml Lowry B). Folin-Ciocalteu reaktifi kullanımdan önce 1:3 hacim oranında  $\text{H}_2\text{O}$  ile seyreltildi. Tüm yüzdeler (ağırlık/hacim) olarak verildi.

### Folin Reaktifi Yöntemiyle Toplam Fenolik Analizi

Propolis ekstraktlarının toplam fenolik içeriği, Güçlü ve ark., (2005) tarafından önerilen Folin yöntemine göre belirlendi [16]. 0.5 ml seyreltik propolis ekstraktına 1.5 ml distile su ilave edildi. Üzerine 2.5 ml Lowry C solüsyonu eklendi ve karışım 10 dakika beklemeye bırakıldı. Bu süre sonunda 0.25 ml Folin reaktifi ilave edilerek oluşan mavi rengin stabil hale gelmesi için 30 dakika daha beklendi. Absorbans değerleri, örnek içermeyen kör reaktife karşı bir UV-Vis spektrofotometrede (UV-1280, Shimadzu, Japan) 750 nm'de ölçüldü. Propolis ekstraktının toplam fenolik içeriği aşağıdaki eşitliğe (2) göre mmol TR/g- propolis ekstrakt olarak hesaplandı.

$$\text{Toplam fenolik (mmol TR/g – ekstrakt)} = \frac{A}{\epsilon_{\text{TR}}} \times \frac{V_t}{V_0} \times S_f \times \frac{V_E}{m} \quad (2)$$

Burada; A: 750 nm'de ölçülen numune absorbansı;  $\epsilon_{\text{TR}}$ : Folin yönteminde TR bileşiğinin molar absorpsiyon katsayısı:  $4.65 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [16];  $V_t$ : Folin yöntemi ölçüm çözeltisinin toplam hacmi (4.75 ml);  $V_0$ : Örnek hacmi (0.5 ml);  $S_f$ : Seyreltme faktörü (seyreltme yapılmayacaksa bu faktör "1" olarak alınır);  $V_E$ : Hazırlanan ekstraktın hacmi (50 ml); m: Ekstraksiyon işleminde alınan numune miktarı (0.051 g).

### Fenolik Bileşenlerin Analizi

Fenolik bileşiklerin miktar tayini daha önce Caponio ve diğerleri tarafından bildirilen yöntemle gerçekleştirildi [17]. Ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) kullanıldı. Kullanılan analitik HPLC sistemi, bir SCL-10 Avp Sistemi kontrolörü, bir SIL-10AD vp Otomatik Örnekleyici, bir LC-10AD vp pompası, bir DGU-14a degazör, bir CTO-10 A vp kolon ısıtıcısı ve 278 nm ye ayarlanmış bir diyot dizisi dedektöründen oluşuyordu. Ayırma, 30 °C'de bir Agilent Eclipse 5µm XDB 250 x 4,6 mm kolon üzerinde gerçekleştirildi. Akış hızı 0.8 mL dk-1, enjeksiyon hacmi 20 µL idi. İki çözücünün gradyan elüsyonu kullanıldı: Solvent A, asetik asit-su (3:97, v/v), solvent B: metanol ve kullanılan gradyan programından oluşuyordu. Analitik veriler, bir Shimadzu Sınıfı-VP Kromatografi Laboratuvarı Otomatik Yazılım Sistemi (Chiyoda-ku, Tokyo, Japonya) kullanılarak değerlendirildi. Ekstrakttaki fenolik bileşiklerin miktarı, her fenolik standart için oluşturulan harici kalibrasyon eğrileri kullanılarak µg/g ekstrakt olarak hesaplandı.

### Toplam Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi

Propolis ekstraktlarının toplam antioksidan kapasitesi, Apak ve ark., (2006) tarafından geliştirilen CUPRAC metoduna göre belirlendi [18]. Propolis ekstraktının CUPRAC metoduna göre toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için; 0.110 g propolis ekstraktı tartıldı ve üzerine 50 ml %96'lık etanol ilave edildi ve 8 kat etanolle seyreltilerek son nihai çözüldüden 0.5 mL örnek alınarak aşağıdaki formül uygulandı. Her test 3 paralel olarak hazırlandı. Kısaca, cam bir tüpe sırasıyla 1 ml bakır(II) çözeltisi (10mM), 1 ml neocuproin çözeltisi (7.5mM) ve 1 ml amonyum asetat tamponu (1M, pH:7) eklendi. Daha sonra, 8 kat etanol ile seyreltilmiş ekstrakt çözeltisinden 0.5 ml ve 0.6 ml distile su eklenerek son hacim 4.1 ml'ye tamamlandı. Toplam 4.1 ml hacimde hazırlanan çözümler oda koşullarında 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda örnek içermeyen referans çözeltisine karşı absorbans değerleri, bir UV-Vis spektrofotometrede (UV-1280, Shimadzu, Japan) 450 nm' de ölçüldü.

Referans Çözeltisi: 1 ml Cu(II) + 1 ml Nc + 1 ml NH<sub>4</sub>Ac + 1.1 ml H<sub>2</sub>O

Numune Çözeltisi: 1 ml Cu(II) + 1 ml Nc + 1 ml NH<sub>4</sub>Ac + 0.5 ml numune çözeltisi + 0.6 ml H<sub>2</sub>O

Saf troloks standardı (TR) için kalibrasyon eğrisi orijinden geçen bir çizgi olduğundan, nihai solüsyondaki ekstrakt numunesinin troloks eşdeğer molar konsantrasyonu, gözlemlenen absorbansın troloks için  $\epsilon$  'ye bölünmesiyle bulunabilir (optik kuvvet kalınlığı = 1 cm). Troloksa eşdeğer antioksidan kapasitesi (TEAK), tüm seyreltmeler göz önünde bulundurularak orijinal ekstreye kadar izlenebilir ve milimol TR/g -kuru madde birimi cinsinden bir kapasite bulmak için alınan numunenin başlangıç kütlesiyle orantılıdır [18]. Propolis ekstraktının toplam antioksidan kapasitesi aşağıdaki eşitliğe (3) göre mmol troloks/g- propolis ekstrakt TEAK eşdeğeri olarak hesaplandı.

$$\text{TAK (mmol TR/g – ekstrakt)} = \frac{A}{\epsilon_{\text{TR}}} \times \frac{V_t}{V_0} \times S_f \times \frac{V_E}{m} \quad (3)$$

Burada; TAK: toplam antioksidan kapasite; A: 450 nm'de ölçülen numune absorpsansı;  $\epsilon_{\text{TR}}$ : CUPRAC yönteminde TR bileşiğinin molar absorpsiyon katsayısı:  $1.67 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [19];  $V_t$ : CUPRAC yöntemi ölçüm çözeltisinin toplam hacmi (4.1 ml);  $V_0$ : Örnek hacmi (ml);  $S_f$ : Seyreltme faktörü (seyreltme yapılmıyacaksa bu faktör "1" olarak alınır);  $V_E$ : Hazırlanan ekstraktın hacmi (ml);  $m$ : Ekstraksiyon işleminde alınan numune miktarı (g).

### Sızma Zeytinyağının Antioksidanlarla Zenginleştirilmesi

Sızma zeytinyağının deney setleri aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

- ✓ Sızma zeytinyağı (boş)
- ✓ 200 ppm BHA (%0.02, w/w) ile birleştirilmiş sızma zeytinyağı
- ✓ 200 ppm BHT (%0.02, w/w) ile birleştirilmiş sızma zeytinyağı
- ✓ 2500 ppm propolis ekstraktı (% 0.25, w/w) ile birleştirilmiş sızma zeytinyağı

Yağ numunelerindeki BHT ve BHA konsantrasyonu, Codex Alimentarius Komisyonu tarafından belirlenen seviyeye karşılık gelen %0.02 (w/w) idi [20].

### Schaal Oven Testi

Hızlandırılmış depolama koşulları altında yağların oksidatif stabilitesi üzerindeki etkisini belirlemeyi amaçlayan schaal oven testi Tinello ve Lante tarafından tarif edildiği gibi gerçekleştirilmiştir [21]. Ayrıntılı olarak, yağ numuneleri, alüminyum folyo ile kaplanmış sızdırmaz şişelere, üst boşluk bırakılmadan hassas bir şekilde tartılmış ( $30 \text{ g} \pm 0.01 \text{ g}$ ) ve 28 gün boyunca  $60 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  sabit sıcaklıkta bir etüvde saklanmıştır. Numuneler 7 günlük aralıklarla alınmış ve peroksit değerini belirlemek için analizlere tabi tutulmuştur.

### Peroksit Değerinin Belirlenmesi

Peroksit değeri (PD) daha önceki çalışmalarımıza göre belirlendi [22]. Yağ numunesi ( $1 \text{ g} \pm 0.01 \text{ g}$ ), 25 mL asetik asit-kloroform (3:2 v/v) karışımı içinde çözündürüldü ve ardından 0.5 mL doymuş KI solüsyonu eklendi. Reaksiyon solüsyonu 1 dakika kuvvetlice çalkalandı ve karanlıkta 5 dakika oda sıcaklığında tutuldu. 75 mL distile su ve 1 mL %1 nişasta indikatörü eklendikten sonra reaksiyon çözeltisi 0.001 N ile renksiz son noktaya ulaşılan kadar 30 s titre edildi. PD aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

$$\text{PD (meq O}_2\text{/kg yağ)} = (V \times N \times 1000)/m \quad (4)$$

Burada V, yağ örneğine (mL) eklenen sodyum tiyosülfatın hacmidir; N, sodyum tiyosülfatın normalitesidir; m, yağ örneğinin (g) kütesidir.

### Toplam Tokoferol Analizleri

Toplam tokoferol içeriği, Wong ve ark. tarafından açıklanan yöntemle göre belirlendi [23]. 10 mL'lik bir deney tüpüne, 0.2 g etanolik propolis ekstraktı tartıldı. Üzerine toluen (5 ml) ilave edildikten sonra, 3.5 ml 2,2'-bipiridin (%0.07) ve 0.5 ml  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (%0.2) ilave edilip, çözelti %95 etanol kullanılarak 10 ml'ye tamamlandı. 1 dakika sonra 520 nm'de absorpsiyon, referansa karşı spektrofotometrede belirlendi (Referans çözelti örnek yerine toluen içeriyordu ve diğer adımlar aynıydı). Benzer şekilde  $\alpha$ -tokoferolün 50, 100, 150, 200 ve 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$  konsantrasyonları hazırlanarak yukarıda açıklanan yöntemle göre kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Ekstraktaki toplam tokoferoller aşağıdaki eşitlikten (5) hesaplandı ve sonuçlar numunenin gram başına miligram [ $\text{mg } \alpha$ -tokoferolün /g] cinsinden  $\alpha$ -tokoferolün eşdeğerleri olarak ifade edilmiştir.

$$\text{Toplam tokoferoller (ppm)} = (A_e - A_b)/(M \cdot W) \quad (5)$$

Burada  $A_e = 10 \text{ mm}$  hücrede numune absorpsiyonu,  $A_b = 10 \text{ mm}$  hücrede boş absorpsiyon,  $M = \alpha$ -tokoferol kalibrasyonu için absorpsansa karşı ağırlık grafiği ve  $W =$  numunenin ağırlığı (g).



## İstatistiksel Analiz

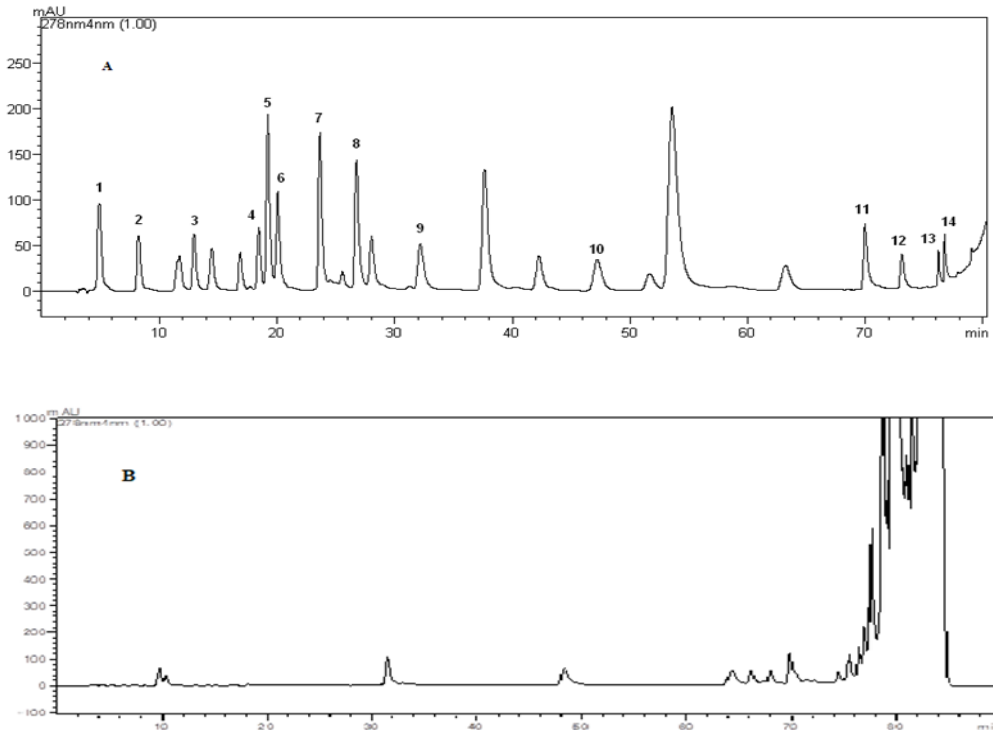
Sunulan veriler (ortalama  $\pm$  standart sapma) en az üç bağımsız deneyden elde edildi ve SPSS tarafından analiz edildi (Windows 10 pro, SPSS Inc. için sürüm 23). Değerler, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve anlamlılık  $p < 0.05$  olarak ayarlanarak post hoc Tukey testi ile analiz edildi.

## SONUÇ VE TARTIŞMA

### Propolisin Ekstraksiyon Verimliliği, Toplam Fenolik İçeriği ve Fenolik Bileşen Profili

Mevcut çalışmada, ultrason destekli ekstraksiyon yöntemiyle, etanol (%96) kullanılarak yüksek bir propolis ekstraktı verimi üretti. Ekstraksiyon verimi  $49.31 \pm 2.22$  idi. Bu verim, literatürde bildirilen bulgularla tutarlıydı [24]. Diğer indirgeyici ajanlar gibi fenolikler de, molibden mavisi tipi bir heteropoli asit reaksiyonunda Folin reaktifi ile reaksiyona girdiğinden [25], Folin testinin sonuçları da troluks (TR) eşdeğerleri olarak bildirilebilir. Çünkü TR bu analizlerde referans olarak kullanılan bir antioksidan bileşiktir ve Folin testi esasında fenollerin yanı sıra diğer antioksidanlara da cevap verdiği için elektron transferine dayalı bir antioksidan kapasite testidir [26]. Mevcut çalışmada propolis ekstraktının toplam fenolik içeriği  $1.67 \pm 0.008$  mmol TR/g-propolis ekstraktı olarak hesaplanmıştır.

Propolis ekstraktının bireysel fenolik bileşenleri, HPLC-DAD ile karakterize edildi. Şekil 1A ve 1B, sırasıyla bir standart kromatogramını ve propolis ekstraktının numune kromatogramını göstermektedir.



**Şekil 1.** A) Standartlar için HPLC kromatogramı. B) Propolis ekstraktında tanımlanan ana fenolik bileşikler için HPLC kromatogramı

1: Gallik asit; 2: Protokateşik asit; 3: p- Hidroksibenzoik asit; 4: epikateşin; 5:sirinjik asit; 6: vanilin; 7: p-kumarik asit; 8: ferulik asit; 9: benzoik asit; 10:hesperidin; 11:kuersetin; 12: luteolin; 13: kaempferol; 14: apigenin

Tablo 1'de  $\mu\text{g}$  fenolik/g-propolis ekstraktında tanımlanan farklı fenolik bileşiklerin miktarları sunulmuştur. Fenolik bileşikler esas olarak fenolik asitler ve flavonoidlerden oluşur. Fenolik asitler, aromatik bir halka, karboksil ve hidroksil gruplarından oluşan bileşiklerdir. Mevcut çalışmada propolis ekstraktındaki benzoik asit miktarı ( $1250 \mu\text{g/g}$ ) diğer fenolik asitlerle karşılaştırıldığında baskındı. Bunu

sırasıyla *p*-Hidroksibenzoik asit (29.3 µg/g), *p*-Kumarik asit (18.3 µg/g), Protokateşik asit (12.5 µg/g), Gallik asit (11.6 µg/g), Sirinjik asit (11.3 µg/g) ve Ferulik asit (10.1 µg/g) izledi. Diğer taraftan, Flavonoid bileşikler, C6-C3-C6 karbon iskeletine sahip, fenil-benzo piron türevlerinden meydana gelen polifenollerdir [27]. Flavonoidler doymamışlık derecesine, üç karbonlu segmentin oksidasyon derecesine ve bağlı hidroksil gruplarının sayısına göre ayrılırlar. Hesperidin, propolis ekstraktında nicel olarak en bol bulunan flavonoiddi (4753.1 µg/g). Propolis ekstraktının diğer önemli flavonoid bileşenleri şu şekilde tanımlanmıştır; apigenin (1554 µg/g), kaempferol (1509 µg/g), kuersetin (1485 µg/g), epikateşin (290 µg/g) ve luteolin (240 µg/g). Sonuçlar, propolis ekstraktının fenolik bileşikler açısından zengin olduğunu ortaya koydu.

**Tablo 1.** Propolis ekstraktında tanımlanan fenolik bileşiklerin profili.

Bileşen	Ahkonma zamanı	propolis ekstrakt (µg /g)
Gallik asit	4.9	11.6
Protokateşik asit	8.3	12.4
<i>p</i> - Hidroksibenzoik asit	13.1	29.3
Epikateşin	18.7	290.3
Sirinjik asit	19.5	11.3
Vanilin	20.3	18.4
<i>p</i> -Kumarik asit	24.0	18.3
Ferulik asit	27.2	10.1
Benzoik asit	32.9	1251.0
Hesperidin	48.3	4753.1
Kuersetin	70.4	1485.9
Luteolin	73.5	240.9
Kaempferol	76.3	1509.3
Apigenin	76.9	1554.9

Propolis ekstraktında kafeik asit 1,1-dimetilalil ester, kafeik asit benzil ester ve izoferulik asit benzil ester güçlü alerjenler olarak sınıflandırılmıştır [28]. Sınıflandırmaya göre, kafeik asit sinamil ester ve izoferulik asit fenetil ester, propoliste düşük konsantrasyonlarda bulunan orta derecede alerjendir. Propoliste düşük ve yüksek konsantrasyonlarda bulunan zayıf alerjenler benzoik asit ve sinamik asitken, yalnızca düşük konsantrasyonlarda bulunanlar ise vanilin, ferulik asit benzil ester, sinamil alkol, izoferulik asit sinamil ester, izoferulik asit 3-metil-2- butilen ester ve nerolidol'dür [29]. Bu bilgiler ışığında değerlendirildiğinde elde ettiğimiz propolis ekstraktında güçlü ve orta derecede alerjen bileşen olmadığı görülmüştür.

### Propolis Ekstraktının Antioksidan Kapasitesi

Bu çalışmada propolis ekstraktının toplam antioksidan kapasitesi CUPRAC yöntemine göre belirlenmiştir. CUPRAC reaktifi, diğer kromojenik reaktiflere (örn. ABTS, DPPH) göre daha kararlı ve erişilebilir avantajlara sahiptir [30]. CUPRAC yönteminde, antioksidan aktivitenin ölçümü, bakırın (II) varlığında bakır (I)'e indirgenmesiyle elde edilen sarı-turuncu bir kompleksin (bakır (I)-eocuproin) absorbans değerinin belirlenmesi ilkesine dayanır. 450 nm'de antioksidan bileşiklerin Bakır İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) yöntemi, besin bileşenleri, sentetik antioksidanlar ve C ve E vitaminleri dahil olmak üzere birçok farklı bileşeni uygulamak için basit ve çok yönlü bir antioksidan kapasite yöntemidir. CUPRAC testine göre, propolis ekstraktının  $2.013 \pm 0.03$  mmol TR/g- propolis ekstrakt olarak hesaplandı. Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerinden toplanan propolis örneklerinin CUPRAC yöntemine göre toplam antioksidan kapasitesi 0.71 ile 8.24 mmol TR/g- propolis ekstraktı arasında bulunmuştur [31].

## Propolis Ekstraktının Lipid Oksidasyonu Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi

Propolisin gıdaya eklenmesi, insanlar için faydalı özelliklerin korunması ve gıdaların korunması ile birlikte gıdadaki lezzetini ve kokusunu en aza indirecek şekilde seçilmelidir [32]. Balık, sosis, kümes hayvanları eti ürünleri, elma suyu, süt ve bal gibi çeşitli gıda ürünlerine minimal propolis ekstraktının eklenmesi (yani,  $\leq 0.5\%$ ) duyuşsal olarak kabul görmektedir [28]. Çok sayıda rapora göre propolis toksik değildir ve güvenlidir. İnsanlar için hesaplanan güvenli doz günde 1.4 mg/kg vücut kütlesi veya yaklaşık 70 mg/gün'dür [33]. Raporlara göre, propolise alerjisi olan kişilerin yüzdesi %1.2 ile %6.6 arasında değişmektedir [34]. Ayrıca, propolisin içerdiği alerjenlere daha fazla maruz kalma tehdidi altındaki meslek grubunun, hammadde ile günlük temas halinde olan arıcılar olduğu kanıtlanmıştır [35]. Bu çalışmada, yukarıda sunulan veriler dikkate alınarak, yağa % 0.25 propolis ekstraktı katkısının uygun olabileceği varsayılmıştır. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif parçalanması lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu, kendi kendini idame ettiren bir zincirleme reaksiyon olarak ilerler ve oldukça zararlıdır. Yağ asitlerinin doymamış bağları, peroksidasyon ürünleri oluşturmak için moleküler oksijenden türetilen serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer. Aktif metilen gruplarının varlığında peroksitler de kararsızdır ve dihidroperoksitlere ve ikincil oksidasyon ürünlerine dönüşür. Hidroperoksitler, istenmeyen bir tat olmaksızın lipid oksidasyonunun birincil ürünleridir, buna karşın ikincil oksidasyon ürünleri çoğunlukla kokuşmuş tattan sorumludur [36]. Peroksit değeri (PD), yemeklik yağlarda oksidasyonun başlangıç seviyesini ölçmek için kullanılır ve birincil oksidasyon ürünleridir [37]. Daha yüksek bir PD, daha düşük bir oksidatif stabiliteye bağlanır [38]. 60 °C'de farklı sürelerde depolama sırasında BHA, BHT ve propolis ekstraktı ile birleştirilmiş sızma zeytinyağının PD'indeki (meq O<sub>2</sub> / kg - yağ) değişiklikler Tablo 2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Farklı süreler için 60 °C'de depolama sırasında BHA, BHT ve propolis ile birleştirilmiş sızma zeytinyağının peroksit değerindeki (meq O<sub>2</sub>/kg-yag) değişiklikler

Yağ örneği	Depolama zamanı (gün)	PD (meq O <sub>2</sub> /kg-yag)			
		Boş	BHA	BHT	PROPOLİS
Sızma Zeytinyağı	0	6.69 ± 0.07 <sup>b</sup>	6.81 ± 0.37 <sup>b</sup>	6.66 ± 0.18 <sup>b</sup>	7.57 ± 0.05 <sup>a</sup>
	7	17.97 ± 0.30 <sup>a</sup>	11.61 ± 0.17 <sup>b</sup>	11.10 ± 0.59 <sup>b</sup>	8.12 ± 0.49 <sup>c</sup>
	14	34.19 ± 0.69 <sup>a</sup>	22.49 ± 0.31 <sup>b</sup>	16.62 ± 0.44 <sup>c</sup>	9.12 ± 0.23 <sup>d</sup>
	21	46.77 ± 0.52 <sup>a</sup>	35.02 ± 0.78 <sup>b</sup>	22.38 ± 0.24 <sup>c</sup>	10.01 ± 0.14 <sup>d</sup>
	28	78.93 ± 1.76 <sup>a</sup>	49.32 ± 0.61 <sup>b</sup>	32.91 ± 0.82 <sup>c</sup>	11.96 ± 0.84 <sup>d</sup>

Ortalama ± standart sapma. Yağ örneği için aynı satırdaki ortalama değerler (n=3) ve ardından farklı harfler (a,b,c ve d) önemli ölçüde farklı olduğunu gösterir (p < 0.05). Kısaltmalar: PD, peroksit değeri; BHA, bütillenmiş hidroksianisol BHT, bütillenmiş hidroksitoluen.

28 günlük depolama süresi boyunca, antioksidan içeren ve içermeyen yağ örneklerinin PD değerleri artmıştır. 28. günde, boş sızma zeytinyağının daha yüksek PD'si vardı (78.93 meq O<sub>2</sub> / kg - yağ). 28. günün sonunda, propolis ekstraktı ile zenginleştirilmiş zeytinyağı, önemli ölçüde (p < 0.05) daha düşük PD değerlerine (11.96 meq O<sub>2</sub>/kg yağ) sahipti. Propolis ekstraktındaki fenolik bileşiklerin antioksidan özellikleri, zeytinyağının oksidasyonunu geciktirme konusunda büyük bir yetenek göstermiştir. Aslında propolis ekstraktında bulunan fenolik bileşiklerden biri olan kuersetin'in lipid oksidasyonunun gecikmesine katkı sağladığı söylenebilir. Çünkü kuersetin'in çoklu doymamış yağ asitlerince zengin deniz yağlarında lipid oksidasyonunu engellediği daha önce bildirilmişti [39]. BHA ve BHT gibi sentetik antioksidanlarla karşılaştırıldığında propolis ekstraktları lipid oksidasyonu üzerinde etkili bir koruma yeteneğine sahipti. Depolama sonunda, sentetik antioksidan (BHT) içeren zeytinyağının (32.91 meq O<sub>2</sub>/kg yağ) PD değeri, boş ve BHA içeren zeytinyağının PD değerinden düşük, ancak propolis özü ile birleştirilmiş zeytinyağının PD değerinden daha yüksekti. 28. günde, BHA ile birleştirilen zeytinyağının PD değerleri (49.32 meq O<sub>2</sub>/kg yağ), propolis özü ve BHT'nin dahil edildiği

karşılık gelen yağlardan önemli ölçüde ( $p < 0.05$ ) daha yüksek PD değerlerine sahipti. BHA, zeytinyağında oksidasyona karşı daha düşük yetenek sergilemiştir.

### Toplam Tokoferol Analizi

Farklı zamanlarda BHA, BHT ve propolis ekstraktı ile birleştirilmiş sızma zeytinyağının toplam tokoferollerindeki (mg/kg yağ) değişiklikler Tablo 3'te sunulmuştur. Tokoferoller yaygın olarak yenilebilir yağlarda bulunur ve güçlü antioksidan aktivite sergiler. Antioksidan eklenmiş veya eklenmemiş tüm yağ numunelerinin toplam tokoferol içeriği depolamanın 0. gününden depolamanın son gününe kadar düşmüştür. 28 günlük depolama sırasında, boş sızma zeytinyağının toplam tokoferol içeriği keskin bir şekilde azaldı (147.98 mg/kg). Antioksidanlar arasında BHA, tokoferollerin (304.55 mg/kg) bozulmasını önlemede daha düşük bir korumaya sahipti. 28. günde, BHT ile zenginleştirilmiş zeytinyağında kalan tokoferoller 631 mg/kg olmuştur. Propolis ekstraktının zeytinyağına dahil edilmesi, sentetik antioksidanlara (BHA ve BHT) kıyasla tokoferollerin bozunma hızını daha da yavaşlattı. 28. günde, propolis ekstraktı ile zenginleştirilmiş zeytinyağında kalan tokoferoller 967.34 mg/kg idi. Propolis ekstraktının (%0.25) yağ numunelerine eklenmesi, tokoferol bozulmasını önemli ölçüde engellemiştir ve tokoferol bozulmasının bu inhibisyonu, içerdiği flavonoidler ve fenolik bileşiklerle ilişkili olabilir [40]. 28. günün sonunda, propolis ekstraktı ile zenginleştirilmiş yağda neredeyse toplam tokoferoller bozulmamıştır.

**Tablo 3.** Farklı süreler için BHA, BHT ve propolis ile birleştirilmiş sızma zeytinyağının toplam tokoferollerindeki (mg/kg yağ) değişiklikler

Yağ örneği	Depolama süresi (gün)	Boş	BHA	BHT	PROPOLİS
Sızma zeytinyağı	0	1005 ± 15.93	1044±12.85	1068.11 ± 34.33	1095 ± 26.02
	28	147.98 ± 20.87	304.55 ± 4.9	631.08 ± 19.14	967.34 ± 40.46

Bu çalışmada propolis ekstraktlarının, polifenol içeriği, bireysel fenolik bileşenleri ve toplam antioksidan kapasitesi detaylı olarak tartışılmıştır. Ayrıca propolis ekstraktlarının lipid oksidasyonuna karşı koruyucu etkisi değerlendirildi. Veriler, propolisin polifenol ve bireysel fenolik bileşikler açısından zengin olduğunu gösterdi. *In vitro* antioksidan yöntemler kullanılarak propolisin güçlü antioksidan özelliklere sahip olduğu bulunmuştur. Sonuçlar, propolis ekstraktının zeytinyağının oksidasyonunu geciktirmede BHA ve BHT gibi sentetik antioksidanlara kıyasla daha etkili olduğunu göstermiştir. Araştırma bulguları, sentetik antioksidanlar (BHA ve BHT) ile karşılaştırıldığında, yenilebilir yağların oksidasyonunu geciktirmede daha etkili olduğunu ortaya koydu. Dahil edilen yağlar, daha düşük peroksit değeri ve kısmen azaltılmış tokoferol içeriği dahil olmak üzere çok daha iyi kimyasal stabilite sergiledi. Sentetik antioksidanlara alternatif olarak propolis ekstraktı, yenilebilir bitkisel yağların stabilizasyonunu iyileştirmek için etkili bir doğal antioksidan olarak önerilebilir. Propolis ekstraktlarının gıda endüstrisinde kullanımının yağları oksidasyondan korumanın etkili bir yolu olduğu söylenebilir. Bununla birlikte, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), propolisin tüm özelliklerinin bulunmaması ve çeşitli propolis formülasyonlarının bileşimindeki farklılıklar nedeniyle, gıda ürünleri etiketlerine eklenecek propolis ile ilgili sağlık beyanlarını üretim yeri ve ekstraksiyon yöntemine bağlı olarak şu ana kadar yayınlamamıştır [41]. Bu nedenle, propolis ekstraktının farklı yemeklik yağlar üzerindeki koruyucu etkilerini kapsamlı bir şekilde araştırmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

### TEŞEKKÜR

Bu araştırma, kamu, ticari veya kar amacı gütmeyen sektörlerdeki finansman kuruluşlarından herhangi destek almamıştır.

## YAZAR KATKILARI

Kavram: Ü.E.; Tasarım: Ü.E.; Denetim: Ü.E.; Kaynaklar: Ü.E.; Malzemeler: Ü.E.; Veri Toplama ve/veya İşleme: Ü.E.; Analiz ve/veya Yorumlama: Ü.E.; Literatür Taraması: Ü.E.; Makalenin Yazılması: Ü.E.; Kritik İnceleme: Ü.E.; Diğer: Ü.E.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## ETİK KURUL ONAYI

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

## KAYNAKLAR

1. Choi, Y.M., Noh, D.O., Cho, S.Y., Suh, H.J., Kim, K.M., Kim, J.M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT-Food Science and Technology*, 39(7), 756-761. [\[CrossRef\]](#)
2. Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3), 235-240. [\[CrossRef\]](#)
3. Mohammadzadeh, S., Sharriatpanahi, M., Hamed, M., Amanzadeh, Y., Ebrahimi, S.E.S., Ostad, S.N. (2007). Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chemistry*, 103(3), 729-733. [\[CrossRef\]](#)
4. Kimoto, T., Aga, M., Hino, K., Koya-Miyata, S., Yamamoto, Y., Micallef, M.J., Kurimoto, M. (2001). Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepillin C, an active ingredient of Brazilian propolis. *Anticancer Research*, 21(1A), 221-228.
5. Osés, S.M., Pascual-Maté, A., Fernández-Muiño, M.A., López-Díaz, T.M., Sancho, M.T. (2016). Bioactive properties of honey with propolis. *Food chemistry*, 196, 1215-1223. [\[CrossRef\]](#)
6. Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food chemistry*, 84(3), 329-339. [\[CrossRef\]](#)
7. Banskota, A.H., Tezuka, Y., Adnyana, I.K., Ishii, E., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S. (2001). Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine*, 8(1), 16-23. [\[CrossRef\]](#)
8. Chaillou, L.L., Nazareno, M.A. (2009). Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. *LWT-Food Science and Technology*, 42(8), 1422-1427. [\[CrossRef\]](#)
9. Gülçin, İ. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 210-218. [\[CrossRef\]](#)
10. Maqsood, S., Benjakul, S., Abushelaibi, A., Alam, A. (2014). Phenolic compounds and plant phenolic extracts as natural antioxidants in prevention of lipid oxidation in seafood: A detailed review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(6), 1125-1140. [\[CrossRef\]](#)
11. Karami, H., Rasekh, M., Mirzaee-Ghaleh, E. (2020). Qualitative analysis of edible oil oxidation using an olfactory machine. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(5), 2600-2610. [\[CrossRef\]](#)
12. Yıldız, S., Turan, S., Kiralan, M., Ramadan, M.F. (2021). Antioxidant properties of thymol, carvacrol, and thymoquinone and its efficiencies on the stabilization of refined and stripped corn oils. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(1), 621-632. [\[CrossRef\]](#)
13. Shahidi, F., Zhong, Y. (2010). Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(9), 930-940. [\[CrossRef\]](#)
14. Haas, E.M., Levin, B. (2006) *Staying Healthy with Nutrition: The Complete Guide to Diet & Nutritional Medicine*, 21st Century Edition Celestial Arts, California.
15. Zhang, Q.A., Zhang, Z.Q., Yue, X.F., Fan, X.H., Li, T., Chen, S.F. (2009). Response surface optimization of ultrasound-assisted oil extraction from autoclaved almond powder. *Food Chemistry*, 116(2), 513-518. [\[CrossRef\]](#)
16. Güçlü, K., Altun, M., Özyürek, M., Karademir, S.E., Apak, R. (2006). Antioxidant capacity of fresh, sun- and sulphited-dried Malatya apricot (*Prunus armeniaca*) assayed by CUPRAC, ABTS/TEAC and folin methods. *International Journal Of Food Science & Technology*, 41, 76-85. [\[CrossRef\]](#)
17. Caponio, F., Alloggio, V., Gomes, T. (1999). Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*, 64(2), 203-209. [\[CrossRef\]](#)

18. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Esin Karademir, S., Erçağ, E. (2006) The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57, 292-304. [\[CrossRef\]](#)
19. Çelik, S.E., Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R. (2010). Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. *Talanta*, 81(4-5), 1300-1309. [\[CrossRef\]](#)
20. Codex Alimentarius Commission, Codex General Standard for Food Additives (FAO/WHO, 2019) Retrieved from <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/gsfa/en/>. Erişim tarihi: 25.08.2022.
21. Tinello, F., Lante, A. (2020). Accelerated storage conditions effect on ginger-and turmeric-enriched soybean oils with comparing a synthetic antioxidant BHT. *LWT-Food Science and Technology*, 131, 109797. [\[CrossRef\]](#)
22. Erdoğan, Ü., Gökçe, E.H. (2021). Fig seed oil-loaded nanostructured lipid carriers: Evaluation of the protective effects against oxidation. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(10), e15835. [\[CrossRef\]](#)
23. Wong, M.L., Timms, R.E., Goh, E.M. (1988). Colorimetric determination of total tocopherols in palm oil, olein and stearin. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 65(2), 258-261. [\[CrossRef\]](#)
24. Chong F.C., Chua L.S. (2020). Effects of solvent and pH on stingless bee propolis in ultrasound-assisted extraction. *AgriEngineering*, 2, 308-316.
25. Santos-Buelga, C., Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds—nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1094-1117. [\[CrossRef\]](#)
26. Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856. [\[CrossRef\]](#)
27. Khadem, S., Marles, R.J. (2010). Monocyclic phenolic acids; hydroxy-and polyhydroxybenzoic acids: occurrence and recent bioactivity studies. *Molecules*, 15(11), 7985-8005. [\[CrossRef\]](#)
28. Pobiega, K., Kraśniewska, K., Gniewosz, M. (2019). Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality-A review. *Trends in Food Science & Technology*, 83, 53-62. [\[CrossRef\]](#)
29. Basista-Soltys, K., Filipek, B. (2013). Allergic potential of propolis-a literature review. *Alergia Astma Immunologia*, 18(1), 32-38.
30. Özyürek, M., Güçlü, K., Tütem, E., Başkan, K.S., Erçağ, E., Çelik, S.E., Apak, R. (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical Methods*, 3(11), 2439-2453. [\[CrossRef\]](#)
31. Sarıkahya, N.B., Gören, A.C., Okkalı, G.S., Çöven, F.O., Orman, B., Kırıcı, D., Nalbantsoy, A. (2021) Chemical composition and biological activities of propolis samples from different geographical regions of Turkey. *Phytochemistry Letters*, 44, 129-136. [\[CrossRef\]](#)
32. Wang, C.Y., Chen, B.H. (2006). Tomato pulp as source for the production of lycopene powder containing high proportion of cis-isomers. *European Food Research and Technology*, 222(3), 347-353. [\[CrossRef\]](#)
33. Walgrave, S.E., Warsaw, E.M., Glesne, L.A. (2005). Allergic contact dermatitis from propolis. *Dermatitis*, 16(4), 209-215.
34. Münstedt, K., Kalder, M. (2009). Contact allergy to propolis in beekeepers. *Allergologia et Immunopathologia*, 37(6), 298-301. [\[CrossRef\]](#)
35. Burdock, G.A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), 347-363. [\[CrossRef\]](#)
36. Choe, E., Min, D.B. (2007). Chemistry of deep-fat frying oils. *Journal of Food Science*, 72(5), R77-R86. [\[CrossRef\]](#)
37. Iqbal, S., Bhangar, M.I. (2007). Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chemistry*, 100(1), 246-254. [\[CrossRef\]](#)
38. Naghshineh, M., Ariffin, A.A., Ghazali, H.M., Mirhosseini, H., Mohammad, A.S. (2010). Effect of saturated/unsaturated fatty acid ratio on physicochemical properties of palm olein-olive oil blend. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(3), 255-262. [\[CrossRef\]](#)
39. Montero, P., Giménez, B., Pérez-Mateos, M., Gómez-Guillén, M. (2005). Oxidation stability of muscle with quercetin and rosemary during thermal and high-pressure gelation. *Food Chemistry*, 93(1), 17-23. [\[CrossRef\]](#)
40. Marquale, F.D., Stracieri, K.M., Fonseca, M.J.V., Freitas, L.D. (2006). Spray-dried propolis extract. I: physicochemical and antioxidant properties. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61(4), 325-330.

41. EFSA. (2010). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to propolis (ID 1242, 1245, 1246, 1247, 1248, 3184) and flavonoids in propolis (ID 1244, 1644, 1645, 3526, 3527, 3798, 3799) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal, 8(10), 1810. [\[CrossRef\]](#)





## COMPARISON OF ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF SOME POLYPHENOLIC COMPOUNDS AND THEIR BIOTRANSFORMATION EXTRACTS

*BAZI POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN VE BİYOTRANSFORMASYON EKSTRELERİNİN ANTİOKSİDAN VE ANTİ-ENFLAMATUVAR AKTİVİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI*

Damla KIRCI<sup>1,2\*</sup> , Betül DEMİRCİ<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Selçuk University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 42010, Konya, Turkey

<sup>2</sup>Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, 26000, Eskişehir, Turkey

<sup>3</sup>Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 26000, Eskişehir, Turkey

### ABSTRACT

**Objective:** Microbial transformations are green biotechnological processes where different microorganisms or enzymes are used to produce new metabolites from defined substrates. Hesperidin, quercetin, and their derivatives have been proven in scientific research to have a variety of biological activities, such as antioxidant, antimicrobial, and anticancer activities.

**Material and Method:** This study performed the microbial transformation of hesperidin and quercetin utilizing 13 different microbial strains. The transformation extracts of hesperidin and quercetin were investigated in antioxidant (DPPH and ABTS<sup>+</sup> methods) and anti-inflammatory effects.

**Result and Discussion:** The biotransformation of hesperidin was observed in 5 of 13 strains. There were *Rhizopus stolonifera*, *Saccharomyces pararoseus*, *S. cerevisiae*, *Penicillium claviforme*, and *Fusarium solani* while microbial transformation of quercetin was identified *Aspergillus flavus* and *Penicillium claviforme*. The results of this research show that the extracts obtained with the *Aspergillus* and *Penicillium* strains were more effective in terms of antioxidant and anti-inflammatory effects. DPPH: antioxidant activity of *A. flavus* extract (IC<sub>50</sub>: 22.55±0.32 µg/ml) was higher than the other biotransformation extracts. The IC<sub>50</sub> value of *R. stolonifer* from the hesperidin transformation extracts is 25.93±0.36 µg/ml. The microbial transformation of hesperidin by *Penicillium* strain has not been researched previously.

**Keywords:** Anti-inflammatory activity, antioxidant activity, hesperidin, microbial transformation, quercetin

\* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Damla Kırıcı  
e-mail / e-posta: damla.kirci@selcuk.edu.tr, Phone / Tel.: +9003322417978

Submitted / Gönderilme : 28.05.2022

Accepted / Kabul : 07.12.2022

Published / Yayınlanma : 20.01.2023

## ÖZ

**Amaç:** Mikrobiyal transformasyonlar belirlenen substratlardan yeni metabolitler üretmek için farklı mikroorganizmaların veya onların enzimlerinin kullanıldığı yeşil biyoteknolojik süreçlerdir. Hesperidin, kersetin ve türevlerinin antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser özellikleri dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilimsel araştırmalarda kanıtlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada 13 farklı mikrobiyal suş kullanılarak hesperidin ve kersetin mikrobiyal transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Hesperidin ve kersetinin mikrobiyal transformasyonundan elde edilen ekstraların antioksidan (DPPH ve ABTS<sup>+</sup> yöntemleri) ve anti-enflamatuvar aktiviteleri araştırılmıştır.

**Sonuç ve Tartışma:** Hesperidin'in biyotransformasyonu 13 suşdan 5'inde gözlenmiştir. *Rhizopus stolonifera*, *Saccharomyces pararoseus*, *S. cerevisiae*, *Penicillium claviforme* ve *Fusarium solani* iken; Kersetinin mikrobiyal transformasyonu *Aspergillus flavus* ve *Penicillium claviforme* suşlarında gözlemlenmiştir.

Bu çalışmanın sonuçları *Aspergillus* ve *Penicillium* suşları ile yapılan çalışmada elde edilen ekstraların antioksidan ve anti-enflamatuvar aktiviteler açısından daha etkili olduğunu göstermektedir. *A. flavus* ekstresi (IC<sub>50</sub>: 22,55±0,32 µg/ml) DPPH antioksidan aktivitesi diğer biyotransformasyon ekstralarından daha yüksek bulunmuştur. Hesperidin transformasyon ekstralarından *R. stolonifer*'in IC<sub>50</sub> değeri 25,93±0,36 µg/ml'dir. Hesperidin'in *Penicillium* suşu tarafından mikrobiyal dönüşümü daha önce çalışılmamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Anti-enflamatuvar aktivite,, antioksidan aktivite, hesperidin, kersetin, mikrobiyal transformasyon,

## INTRODUCTION

Biotransformation is an alternate technique for producing new bioactive secondary metabolites with much promise. Microbial factories show benefits, for example, multiplying, ease of large-scale production, environment-friendly, and solvent-free. Also, microbial transformation improves the selectivity of natural products without any toxic chemicals. Microbial biotransformation, enzyme engineering, and plant cell co-transformation are some biological techniques for producing bioactive flavonoids. Biotechnological processes for flavonoid production have attracted interest since they allow the production of new flavonoids that do not exist in nature. The utilization of microorganisms to carry out reactions in the asymmetric synthesis of bioactive flavonoids is noteworthy.

The significant reactions during microbial biotransformation are dihydroxylation, hydroxylation, *O*-demethylation, *O*-methylation, deglycosylation, C ring cleavage of the benzo- $\gamma$ -pyrone system, cyclization [1,2].

*Citrus* species have significant levels of flavonoids, which have antioxidant properties; additionally, nutritional citrus has no adverse effects or cytotoxicity in healthy individuals [3]. Hesperidin (hesperetin-7-*O*-rutinoside) belongs to the flavanone group of glycoside flavonoids composed of disaccharide (rutinose) and aglycone unit (hesperetin) [4].

Hesperidin contains a broad spectrum of biological activities, including antioxidant and anti-inflammatory effects, antibacterial and antifungal properties, antidiabetic, Alzheimer's anticancer, anti-HIV, anticoagulant, antiplatelet, and immunomodulatory effects [3,5-8].

Quercetin is a flavonoid and, more specifically, a flavanol, which is a potent antioxidant flavonoid. Onions, grapes, berries, cherries, broccoli, and citrus fruits are high in this plant pigment. Quercetin has been associated to a number of health benefits, such as anti-inflammatory, antiviral, and anticancer effects, and the ability to treat a variety of cardiac diseases. [9,10].

Hesperidin and quercetin have all been found to be limited by its water solubility, particularly following oral administration. In this situation, hesperidin causes significant changes in the physiological effects *in-vitro* and *in-vivo* [9,11,12].

Within the scope of the study, hesperidin and quercetin have been subjected to microbial transformation via different microorganisms and conversion took place. The metabolites have detected with Thin Layer Chromatography (TLC) plate in 12 days. The substrates (hesperidin and quercetin) and

the transformation extracts have been evaluated for their *in vitro* antioxidant activity (DPPH $\cdot$  and ABTS $\cdot^+$  methods) and *in vitro* anti-inflammatory effects.

## MATERIAL AND METHOD

### Chemicals and Microorganism

Hesperidin and Quercetin were purchased from Sigma-Aldrich, Germany.

The following microorganisms are utilized in microbial transformation reactions: *Rhizopus stolonifer* (MF461023), *Aspergillus parasiticus* (NRRL 2999), *A. terreus* var. *africanus* (isolate), *A. alliaceus* (NRRL 317), *A. flavus* (ATCC 9807), *Penicillium valentinum* (Isolate), *P. chrysogenum* (NRRL 792), *P. claviforme* (MR 376), *Fusarium solani* (ATCC 1284), *F. culmorum* (Isolate), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), *S. pararoseus* (ATCC 11385), and *Phanerochaete chrysosporium* (E 446).

### Cultivation and Transformational Conditions

At 5°C and 25°C, the culture was maintained and precultured on potato dextrose agar (PDA) slants, respectively.  $\alpha$ -Medium was used in the microbial transformation assay with fungi prepared, whereas Mueller Hinton Broth was used for the yeast and bacteria. Microorganisms were grown aerobically at 150 rpm on a shaker incubator at 24°C. After two days of growth, hesperidin and quercetin were added, and the fermentations were maintained for another 12 days [13]. Samples were collected from the fermentation medium in the 12<sup>th</sup> day and the samples were extracted with ethyl acetate three times. The ethyl acetate phases were concentrated with a rotary evaporator to dryness under reduced pressure at 40°C. The dried extracts were kept at -20°C until there were tested for antioxidant and enzyme inhibition properties.

### DPPH $\cdot$ Radical Scavenging Antioxidant Activity

The capacity of different fractions to scavenge the stable DPPH $\cdot$  free radicals was measured in the method of Clarke et al. [14]. Following the incubation period and at 517 nm, the absorbance was measured. The control was made by replacing distilled water with the extract, and the standard was ascorbic acid. The percentage of the extract that scavenges DPPH radicals was measured using the formula:

$$\text{DPPH}\cdot \text{ scavenging activity (\%)} = (\text{Ac}-\text{As})/\text{Ac} \times 100$$

Ac: the absorbance of control

As: the absorbance of sample/standard

### ABTS $\cdot^+$ Radical Scavenging Antioxidant Activity

The activity determination was performed via the ABTS $\cdot^+$  cation radical decolorization with minor modifications [15]. The ABTS $\cdot^+$  was prepared by reacting 15 ml of 7 mM aqueous solution of ABTS $\cdot^+$  with 264  $\mu$ l of 140 mM potassium persulphate. Before using the mixture was allowed to rest for 12 hours in the dark at room temperature. The ABTS $\cdot^+$  working solution was diluted with methanol to give an absorbance of 0.70 $\pm$ 0.02 at 734 nm before the test. In a 96-well plate. The reaction mixtures consisted of 50  $\mu$ l sample and 100  $\mu$ L ABTS $\cdot^+$  working solution. After allowing the mixture to sit in the dark for 10 min. the absorbance was estimated at 734 nm. All tests were carried out in triplicate. The percentage scavenging effect was calculated same as the DPPH $\cdot$  assay.

### *In vitro* Anti-inflammatory Activity

According to previous research, inhibition levels of Lipoxygenase (1.13.11.12, Type I-B, 7.9 Unit/mg) enzyme activity were measured spectrophotometrically on a 96-well quartz plate [16]. For 10 minutes at 25°C, potassium phosphate buffer (pH: 8.80), 40  $\mu$ l test compounds, and 20  $\mu$ l lipoxygenase enzyme were incubated. Each well received 300  $\mu$ l of this mixture. The reaction was then started by adding linoleic acid solution and measuring the change in absorbance at 234 nm for 10 minutes. The assays were repeated four times. As a positive control, Nordihydroguaiatic acid (NDGA) was used.

Calculation of the % inhibition was shown below:

$$\% \text{ Inhibition} = (E - S) / E * 100$$

E: The absorbance of the enzyme without a sample

S: The absorbance of the enzyme with the test sample

### Statistical Analysis

GraphPad Prism Software Version 8.0 was used to perform statistical analysis to compare differences in data between the standard and experimental groups. The average and standard deviation were used to express the findings (S.D.). Statistically significant results were compared using a two-way ANOVA with Tukey Multiple Comparison Test, and IBM SPSS Statistics 22 assessed *p*-values of less than 0.05 to be statistically meaningful.

## RESULT AND DISCUSSION

Microbial transformation of Hesperidin and quercetin were carried out using 13 microorganisms. The metabolites were detected using thin-layer chromatography (TLC).

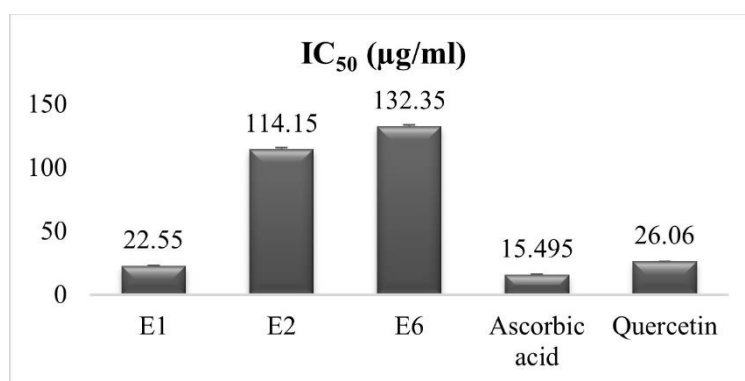
The biotransformation of Hesperidin was observed in 2 of 13 strains. Extracts obtained from biotransformation of quercetin with *Aspergillus flavus* (E1) and *Penicillium claviforme* were shown to be effective (E2). While the metabolite of *P. claviforme* is more polar than quercetin; the metabolite of *A. flavus* are more nonpolar than quercetin.

The biotransformation of Hesperidin was observed in 5 of 13 strains. There are *Rhizopus stolonifera* (E3), *Saccharomyces pararoseus* (E4), *Penicillium claviforme* (E5), *S. cerevisiae* (E6), and *Fusarium solani* (E7). According to the TLC plate, the metabolites of *F. solani*, *S. pararoseus*, *R. stolonifera* and *S. cerevisiae* are more nonpolar than hesperidin. One of the *P. claviforme* metabolites is more polar than hesperidin.

### *In vitro* Antioxidant Activity

The substrates (hesperidin and quercetin) and the transformation extracts were tested for their *in vitro* antioxidant activity by DPPH $\cdot$  and ABTS $^{+\cdot}$  methods.

The antioxidant activity involves different mechanisms such as radical scavenging, iron chelation, and peroxidation delay. In this research, antioxidant mechanisms of quercetin, hesperidin and the transformation extracts were elucidated by DPPH $\cdot$ , and ABTS $^{+\cdot}$  methods. *In vitro* antioxidant activities results (%) of the DPPH $\cdot$ , and ABTS $^{+\cdot}$  methods were given in Tables 1 and 2, respectively. The IC<sub>50</sub> value of the DPPH $\cdot$ , and ABTS $^{+\cdot}$  methods of transformation extracts, positive control and quercetin are illustrated in Figures 1 and 2, respectively.



**Figure 1.** DPPH IC<sub>50</sub> values of the extracts, ascorbic acid and quercetin  
**E1:** *Aspergillus flavus*; **E2:** *Penicillium claviforme*; **E6:** *Saccharomyces cerevisiae*

The transformation extracts of quercetin were observed the highest antioxidant activity in both methods. The biotransformation extract of *Fusarium solani* (E7) ( $18.681 \pm 0.14\%$ , 200  $\mu\text{g/ml}$ ) was quite low. The transformation extract of *Saccharomyces cerevisiae* (E6) ( $58.93 \pm 2.81\%$ , 200  $\mu\text{g/ml}$ ) has more antioxidant potential than other transformation extracts of hesperidin. In this study, the DPPH antioxidant activity of *Aspergillus flavus* extract (E1) ( $\text{IC}_{50}$ :  $22.55 \pm 0.32 \mu\text{g/ml}$ ) was higher than the other biotransformation extracts and their substrate. The positive control of the method is ascorbic acid ( $\text{IC}_{50}$ :  $15.50 \pm 0.62 \mu\text{g/ml}$ ). As a result, the polar components of transformation extracts of quercetin may be mainly responsible for their free radical scavenging capability.

**Table 1.** DPPH Antioxidant activity (%) of the substrates and transformation extracts

	Concentration				F	P
	25 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$		
<b>Quercetin</b>	$45.207 \pm 1.89^b$	$61.877 \pm 0.29^a$	$62.312 \pm 0.14^a$	$63.085 \pm 0.59^a$	6.296	0.017
<b>E1</b>	$48.88 \pm 2.18^c$	$57.432 \pm 0.8^b$	$61.829 \pm 3.94^{ab}$	$67.289 \pm 1.27^a$	32.313	<0.001
<b>E2</b>	$8.027 \pm 0.36^d$	$22.885 \pm 2.32^c$	$52.745 \pm 1.45^b$	$61.152 \pm 1.67^a$	717.813	<0.001
<b>Hesperidin</b>	$11.796 \pm 1.09^a$	$15.782 \pm 3.23^a$	$25.639 \pm 3.62^a$	$31.437 \pm 4.41^a$	13.789	0.017
<b>E3</b>	$11.94 \pm 1.23^c$	$18.83 \pm 2.32^b$	$24.407 \pm 3.99^b$	$34.92 \pm 1.16^a$	46.909	<0.001
<b>E4</b>	$8.433 \pm 1.89^c$	$10.49 \pm 0.36^{bc}$	$14.817 \pm 1.48^b$	$23.573 \pm 4.03^a$	24.478	<0.001
<b>E5</b>	$9.041 \pm 1.38^c$	$15.782 \pm 0.72^b$	$16.362 \pm 4.49^b$	$28.683 \pm 0.58^a$	35.005	<0.001
<b>E6</b>	$18.391 \pm 1.38^d$	$30.76 \pm 0.73^c$	$46.077 \pm 0.38^b$	$58.93 \pm 2.81^a$	357.776	<0.001
<b>E7</b>	$7.519 \pm 2.75^c$	$11.433 \pm 0.29^b$	$11.796 \pm 0.07^b$	$18.681 \pm 0.14^a$	33.558	<0.001

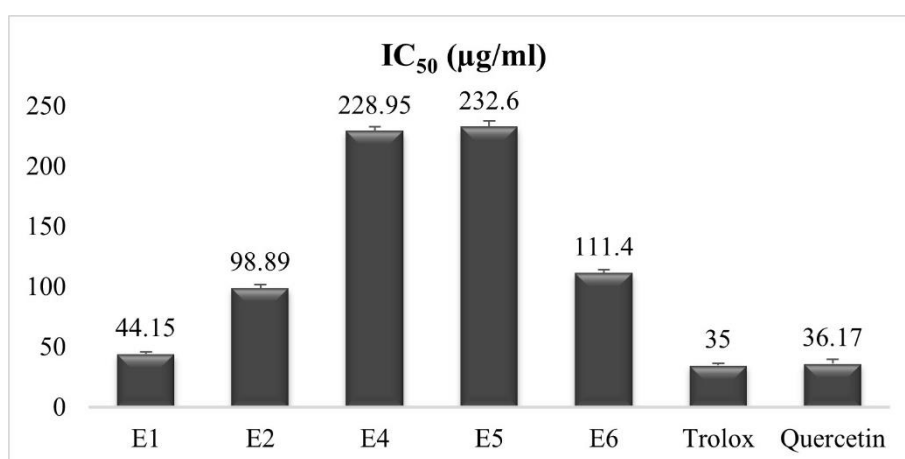
<sup>a-d</sup>: There is no difference between groups with the same letter for each measurement value. There was analyzed by ANOVA Tukey HSD. **E1**: *Aspergillus flavus*; **E2**: *Penicillium claviforme*; **E3**: *Rhizopus stolonifer*; **E4**: *Sporobolomyces pararoeseus*; **E5**: *Penicillium claviforme*; **E6**: *Saccharomyces cerevisiae*; **E7**: *Fusarium solani*

**Table 2.** ABTS<sup>++</sup> Antioxidant activity (%) of the substrates and transformation extracts

	Final Concentration				F	p
	250 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	1 mg/ml	2 mg/ml		
<b>Quercetin</b>	$71.006 \pm 2.25^a$	$71.227 \pm 2.86^a$	$74.492 \pm 1.92^a$	$76.169 \pm 0.79^a$	5.242	0.074
<b>E1</b>	$59.146 \pm 5.14^a$	$59.611 \pm 4.44^a$	$61.612 \pm 0.28^a$	$63.985 \pm 1.35^a$	1.217	0.365
<b>E2</b>	$21.941 \pm 1.55^c$	$55.267 \pm 2.95^b$	$63.111 \pm 3.58^b$	$72.389 \pm 4.05^a$	143.611	<0.001
<b>Hesperidin</b>	$11.796 \pm 1.09^a$	$15.782 \pm 3.23^a$	$25.639 \pm 3.62^a$	$31.437 \pm 4.41^a$	13.789	0.017
<b>E3</b>	$20.193 \pm 3.56^b$	$22.68 \pm 4.41^b$	$44.33 \pm 1.35^a$	$45.002 \pm 1.08^a$	38.307	<0.001
<b>E4</b>	$17.167 \pm 1.08^d$	$24.608 \pm 2.98^c$	$41.372 \pm 2.97^b$	$58.92 \pm 0.47^a$	217.879	<0.001
<b>E5</b>	$26.177 \pm 1.08^d$	$21.112 \pm 1.62^c$	$41.909 \pm 1.61^b$	$58.247 \pm 1.01^a$	457.548	<0.001
<b>E6</b>	$29.269 \pm 0.40^c$	$42.649 \pm 2.62^b$	$65.105 \pm 1.55^a$	$66.428 \pm 2.95^a$	215.928	<0.001
<b>E7</b>	$12.267 \pm 3.00^b$	$15.268 \pm 2.37^b$	$18.758 \pm 3.35^{ab}$	$26.11 \pm 2.72^a$	12.818	0.002

<sup>a-d</sup>: There is no difference between groups with the same letter for each measurement value.

There was analyzed by ANOVA Tukey HSD. **E1**: *Aspergillus flavus*; **E2**: *Penicillium claviforme*; **E3**: *Rhizopus stolonifer*; **E4**: *Sporobolomyces pararoeseus*; **E5**: *Penicillium claviforme*; **E6**: *Saccharomyces cerevisiae*; **E7**: *Fusarium solani*



**Figure 2.** ABTS<sup>+</sup> IC<sub>50</sub> values of the extracts, trolox and quercetin

**E1:** *Aspergillus flavus*; **E2:** *Penicillium claviforme*; **E4:** *Sporobolomyces pararoseus*; **E5:** *Penicillium claviforme*; **E6:** *Saccharomyces cerevisiae*

### In vitro Anti-inflammatory Activity

As for the enzyme inhibitory activity in this work, the inhibitory effects of hesperidin, quercetin and the biotransformation extracts on 5-Lipoxygenase (5-LOX). The results of 5-LOX enzyme inhibition were given in Table 3. In this method, the extracts, hesperidin and quercetin were tested three different doses. % inhibitions, and IC<sub>50</sub> values were calculated.

In our study, while the extracts of *Aspergillus flavus* (E1) and *Penicillium claviforme* (E2) had strong inhibitory activity against 5-LOX, the extract of *Rhizopus stolonifer* (E3) had no activity. The IC<sub>50</sub> value of E3 from the hesperidin transformation extracts is 25.93±0.36 µg/ml. NDGA was used as a positive control and the IC<sub>50</sub> value was found to be 3.63±0.29 µg/ml.

**Table 3.** Anti-inflammatory effect (%) of the substrates and transformation extracts

	Concentration			F	p
	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml		
<b>Quercetin</b>	41.603 ± 3.7 <sup>c</sup>	63.194 ± 1.09 <sup>b</sup>	70.139 ± 1.29 <sup>a</sup>	120.676	<0.001
<b>E1</b>	26.092 ± 0.95 <sup>c</sup>	41.921 ± 4.27 <sup>b</sup>	64.52 ± 1.24 <sup>a</sup>	162.125	<0.001
<b>E2</b>	32.205 ± 2.56 <sup>b</sup>	34.989 ± 5.08 <sup>b</sup>	47.38 ± 2.86 <sup>a</sup>	14.502	0.005
<b>Hesperidin</b>	43.584 ± 4.53 <sup>b</sup>	51.587 ± 3.34 <sup>ab</sup>	61.508 ± 4.01 <sup>a</sup>	15.202	0.004
<b>E3</b>	3.363 ± 1.74 <sup>b</sup>	5.714 ± 0.71 <sup>b</sup>	33.75 ± 5.04 <sup>a</sup>	37.765	<0.001
<b>E4</b>	12.143 ± 1.24 <sup>c</sup>	22.857 ± 1.43 <sup>b</sup>	32.262 ± 1.8 <sup>a</sup>	134.069	<0.001
<b>E5</b>	21.786 ± 1.79 <sup>b</sup>	25.893 ± 1.61 <sup>b</sup>	35.00 ± 2.14 <sup>a</sup>	39.720	<0.001
<b>E6</b>	22.857 ± 2.5 <sup>b</sup>	25.476 ± 2.32 <sup>b</sup>	35.238 ± 2.86 <sup>a</sup>	19.298	0.002
<b>E7</b>	22.262 ± 0.74 <sup>c</sup>	32.679 ± 0.18 <sup>b</sup>	41.25 ± 1.61 <sup>a</sup>	256.916	<0.001

<sup>a-c</sup>: There is no difference between groups with the same letter for each measurement value. There was analyzed by ANOVA Tukey HSD. **E1:** *Aspergillus flavus*; **E2:** *Penicillium claviforme*; **E3:** *Rhizopus stolonifer*; **E4:** *Sporobolomyces pararoseus*; **E5:** *Penicillium claviforme*; **E6:** *Saccharomyces cerevisiae*; **E7:** *Fusarium solani*

In a previous study, biotransformation was performed in an industrial citrus residue extract by *Paecilomyces variotii*. The anti-inflammatory activity in the cell line was investigated without the structure determination of the extract. It was shown further to increase the efficiency of the biotransformation extract through fermentation. It has been shown to further increase the efficiency of the biotransformation extract through fermentation [17].

The previous research was on the biotransformation of the lime peel by *Aspergillus saitoi* in solid medium. The ABTS<sup>+</sup> and DPPH radical scavenging activity of the biotransformation extract was increased compared with unfermented lime peel [18].

On the other hand, the microbial transformation of hesperidin was shown by Dodda et al. There was used for *Cunninghamella elegans*, *C. echinulata*, *C. blakesleeana*, *Aspergillus terreus*, *A. ochraceus*, *A. flavus*, *Gliocladium roseum* and *Rhizopus stolonifer*. *Cunninghamella elegans* was observed to convert hesperidin to hesperetin through hydrolysis, demonstrating a similarity to human metabolism of hesperidin [19]. Also, the microbial transformation was converted from hesperidin to hesperetin (aglycone) by *Streptomyces griseus* and *Pichia kluyveri* [20,21]. Previously the other study, hesperidin was transformed cartamidin and isocartamidin by *Rhodotorula* species [22].

Microbial transformation studies have been carried out with quercetin by *Gliocladium deliquescens* (NRRL 1086) and *Cunninghamella elegant* (ATCC 9245) in the literature [23,24]. 2-Protocatechuic-phloroglucinol carboxylic acid, quercetin 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucoside, 2,4,6-trihydroxy benzoic acid, and protocatechuic acid were transformed from quercetin by *G. deliquescens*.

Microbial transformation of quercetin with *C. elegans* converted to isorhamnetin 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside, kaempferol 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside, and quercetin 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside. Quercetin was first glycosylated, then modified by dehydroxylation and methylation to its metabolites.

The results of this study show us that the extracts obtained with the *Aspergillus* and *Penicillium* strains are more effective in terms of antioxidant and anti-inflammatory activities. The microbial transformation of hesperidin by *Penicillium* strain has not been researched previously.

The high activity of the extracts in this study suggests a synergistic effect between the compounds. In this context, future studies can explain the chemical compositions of the extracts. In addition, our research suggests that the microbial transformation extracts of hesperidin and quercetin can be used as natural antioxidants and anti-inflammatory in the food and pharmaceutical industries.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study is part of the PhD thesis of Damla KIRCI was financially supported as a Scientific Research Project (1901S001) by Anadolu University.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: D.K., B.D.; Design: D.K., B.D.; Control: B.D.; Sources: D.K., B.D.; Materials: D.K., B.D.; Data Collection and/or Processing: D.K.; Analysis and/or Interpretation: D.K., B.D.; Literature Review: D.K.; Manuscript Writing: D.K., B.D.; Critical Review: D.K., B.D.; Other: D.K., B.D.

## 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. Hosoda, R., Horio, Y., Shimoda, K., Hamada, M., Hamada, H., Hamada, H. (2013). Regioselective hydroxylation and glucosylation of flavanones with cultured plant cells of *Eucalyptus perriniana*. *Natural Product Communications*, 8(7), 905-906. [\[CrossRef\]](#)
2. Cao, H., Chen, X., Jassbi, A.R., Xiao, J. (2015). Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. *Biotechnology Advances*, 33(1), 214-223. [\[CrossRef\]](#)

3. Kim, J., Wie, M.B., Ahn, M., Tanaka, A., Matsuda, H., Shin, T. (2019). Benefits of hesperidin in central nervous system disorders: a review. *Anatomy & Cell Biology*, 52(4), 369-377. [\[CrossRef\]](#)
4. Umeno, A., Horie, M., Murotomi, K., Nakajima, Y., Yoshida, Y. (2016). Antioxidative and antidiabetic effects of natural polyphenols and isoflavones. *Molecules*, 21(6), 708. [\[CrossRef\]](#)
5. Ali, A.M., Gabbar, M.A., Abdel-Twab, S.M., Fahmy, E.M., Ebaid, H., Alhazza, I.M., Ahmed, O.M. (2020). Antidiabetic potency, antioxidant effects, and mode of actions of *Citrus reticulata* fruit peel hydroethanolic extract, hesperidin, and quercetin in nicotinamide/streptozotocin-induced Wistar diabetic rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020. [\[CrossRef\]](#)
6. Chikara, S., Nagaprashantha, L.D., Singhal, J., Horne, D., Awasthi, S., Singhal, S.S. (2018). Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Letters*, 413, 122-134. [\[CrossRef\]](#)
7. Pandey, P., Khan, F. (2021). A mechanistic review of the anticancer potential of hesperidin, a natural flavonoid from Citrus fruits. *Nutrition Research*, 92, 21-31. [\[CrossRef\]](#)
8. Miles, E.A., Calder, P.C. (2021). Effects of Citrus fruit juices and their bioactive components on inflammation and immunity: a narrative review. *Frontiers in Immunology*, 12, 2558. [\[CrossRef\]](#)
9. Wang, W., Sun, C., Mao, L., Ma, P., Liu, F., Yang, J., Gao, Y. (2016). The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 56, 21-38. [\[CrossRef\]](#)
10. David, A.V.A., Arulmoli, R., Parasuraman, S. (2016). Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacognosy Reviews*, 10(20), 84-89. [\[CrossRef\]](#)
11. Meneguzzo, F., Ciriminna, R., Zabini, F., Pagliaro, M. (2020). Review of evidence available on hesperidin-rich products as potential tools against COVID-19 and hydrodynamic cavitation-based extraction as a method of increasing their production. *Processes*, 8(5), 549. [\[CrossRef\]](#)
12. Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L.J.D., Singla, A.K. (2001). Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Research*, 15(8), 655-669. [\[CrossRef\]](#)
13. Batur, Ö.Ö., Kıran, İ., Berger, R.G., Demirci, B. (2019). Microbial transformation of  $\beta$ -caryophyllene and longifolene by *Wolfiporia extensa*. *Natural Volatiles and Essential Oils*, 6(3), 8-15.
14. Clarke, G., Ting, K.N., Wiart, C., Fry, J. (2013). High correlation of 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, ferric reducing activity potential and total phenolics content indicates redundancy in use of all three assays to screen for antioxidant activity of extracts of plants from the Malaysian rainforest. *Antioxidants*, 2(1), 1-10. [\[CrossRef\]](#)
15. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [\[CrossRef\]](#)
16. Baylac, S., Racine, P. (2003). Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. *International Journal of Aromatherapy*, 13(2-3), 138-142. [\[CrossRef\]](#)
17. Nakajima, V.M., Moala, T., Moura, C.S., Amaya-Farfan, J., Gambero, A., Macedo, G.A., Macedo, J.A. (2017). Biotransformed citrus extract as a source of anti-inflammatory polyphenols: Effects in macrophages and adipocytes. *Food Research International*, 97, 37-44. [\[CrossRef\]](#)
18. Pérez-Nájera, V.C., Lugo-Cervantes, E., Amaya-Delgado, L., Madrigal-Pulido, J.A., Rueda-Puente, E.O., Borboa-Flores, J., Del-Toro-Sánchez, C.L. (2018). Biotransformation of hesperidin from lime peel (*Citrus limetta* Risso) in solid fermentation by *Aspergillus saitoi*. *CyTA-Journal of Food*, 16(1), 537-543. [\[CrossRef\]](#)
19. Dodda, S., Bandlapalli, S., Vidyavathi, M. (2012). Biotransformation of hesperidine to hesperitine by *Cunninghamella elegans*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(2), 174-178.
20. Wang, Y.Y., Liu, J.H., Yu, B.Y. (2005). Biotransformation of flavonoids by *Streptomyces griseus* ATCC 13273. *Pharmaceutical Biotechnology-Beijing*, 12(5), 308.
21. Escudero-López, B., Cerrillo, I., Gil-Izquierdo, Á., Hornero-Méndez, D., Herrero-Martín, G., Berná, G., Medina, S., Ferreres, F., Martín, F., Fernández-Pachón, M.S. (2016). Effect of thermal processing on the profile of bioactive compounds and antioxidant capacity of fermented orange juice. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67(7), 779-788. [\[CrossRef\]](#)
22. Sordon, S., Madej, A., Popłoński, J., Bartmańska, A., Tronina, T., Brzezowska, E., Juszczak, P., Huszcza, E. (2016). Regioselective ortho-hydroxylations of flavonoids by yeast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(27), 5525-5530. [\[CrossRef\]](#)
23. Jia-Qi, X., Ni, F., Bo-Yang, Y., Qian-Qian, W., Zhang, J. (2017). Biotransformation of quercetin by *Gliocladium deliquescens* NRRL 1086. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 15(8), 615-624. [\[CrossRef\]](#)
24. Zi, J., Valiente, J., Zeng, J., Zhan, J. (2011). Metabolism of quercetin by *Cunninghamella elegans* ATCC 9245. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112(4), 360-362. [\[CrossRef\]](#)





## INTEGRATIVE AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN RATS IN THE SIMULATION OF DOXORUBICIN CHRONIC HEART FAILURE AND DURING THE USE OF B-ADRENERGIC BLOCKERS

*DOKSORUBİSİN İLE OLUŞTURULAN KRONİK KALP YETMEZLİĞİ MODELİNDE VE B-  
ADRENERJİK BLOKERLERİN KULLANIMI SIRASINDA SIÇANLARDA BÜTÜNLEYİCİ VE  
BİYOKİMYASAL PARAMETRELER*

Igor BELENICHEV<sup>1</sup> , Pavlo BAK<sup>1</sup> , Olena POPAZOVA<sup>2\*</sup> , Victor RYZHENKO<sup>3</sup> ,  
Nina BUKHTIYAROVA<sup>4</sup> , Andrii PUZYRENKO<sup>5</sup> 

<sup>1</sup>Zaporizhzhia State Medical University, Department of Pharmacology and Medical Formulation with  
Course of Normal Physiology, 26 Mayakovsky Ave., Zaporizhzhia 69000 Ukraine

<sup>2</sup>Zaporizhzhia State Medical University, Department of Histology, Cytology and Embryology, 26  
Mayakovsky Ave., Zaporizhzhia 69000 Ukraine

<sup>3</sup>Zaporizhzhia State Medical University, Department of Medical and Pharmaceutical Informatics and  
Advanced Technologies, Zaporizhzhia State Medical University 26 Mayakovsky Ave., Zaporizhzhia  
69000 Ukraine

<sup>4</sup>Zaporizhzhia State Medical University, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Zaporizhzhia  
State Medical University, 26 Mayakovsky Ave., Zaporizhzhia 69000 Ukraine

<sup>5</sup>Pathology and Laboratory Medicine, College of Wisconsin, Milwaukee, United States

### ABSTRACT

**Objective:** *In the treatment of chronic heart failure,  $\beta$ -blockers are actively used - Carvedilol, Nebivolol, Metoprolol, Bisoprolol, etc. However, they have a number of serious adverse reactions, and their therapeutic efficacy does not always meet the needs of the clinic. All this prompted the creation of a new potential drug Hypertril (bromide 1-( $\beta$ -phenylethyl)-4-amino-1,2,4-triazolium. We*

\* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Olena Popazova  
**e-mail / e-posta:** popazova.ea@gmail.com, **Phone / Tel.:** +3804726250

**Submitted / Gönderilme :** 15.06.2022

**Accepted / Kabul :** 07.12.2022

**Published / Yayınlanma :** 20.01.2023

aimed to conduct a comparative assessment of  $\beta$ -blockers of different generations and "Hypertril" in the conditions of modeling the doxorubicin model of chronic heart failure (CHF) in terms of the effect on biochemical markers of myocardial damage and integrative parameters.

**Material and Method:** CHF was modeled on 85 white outbred rats weighing 190–220 g by administering doxorubicin at a total dose of 15 mg/kg, nebivolol (10 mg/kg), carvedilol (50 mg/kg), bisoprolol (10 mg/kg), metoprolol (15 mg/kg) and hypertril (3.5 mg/kg) were administered intragastrically once a day as a suspension 1% starchy mucus for 30 days after 14 days of doxorubicin administration. The cardioprotective effect of drugs was assessed by improving integrative parameters (survival, heart mass index, severity in points) and by normalizing cardiospecific markers (NT-proBNP, D-dimer, eNOS, MB-CPK, and ST2).

**Result and Discussion:** The introduction of Hypertril not only prolonged the life of animals with CHF in comparison with the reference drugs, but also prevented early death and contributed to a decrease in the severity of symptoms (hydrothorax, ascites, scrotal edema). The administration of hypertril to rats with CHF led to a decrease in mortality, a decrease in the heart mass index, in the blood of the main cardiospecific markers to the values of intact animals, and also led to an increase in expression of eNOS, which testified to its significant cardioprotective effect with NO-mimetic effect. The obtained results demonstrated the undoubted advantage of Hypertril over the basic  $\beta$ -adrenergic blockers and experimentally substantiated further in-depth studies to create a drug based on it for the treatment of CHF.

**Keywords:** Bromide 1-( $\beta$ -phenylethyl)-4-amino-1,2,4-triazolium, cardioprotection, chronic heart failure, hypertril, endothelial dysfunction, metoprolol,  $\beta$ -blockers

## ÖZ

**Amaç:** Kronik kalp yetmezliğinin tedavisinde karvedilol, nebivolol, metoprolol, bisoprolol vb.  $\beta$ -blokerler aktif olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bir dizi ciddi yan etkileri bulunmakta olup tedavi edici etkinlikleri her zaman kliniğin ihtiyaçlarını karşılamamaktadır. Bütün bunlar yeni bir potansiyel ilacın (Hypertril, bromür 1-( $\beta$ -feniletıl)-4-amino-1,2,4-triazolyum)) geliştirilmesine yol açmaktadır. Farklı nesil  $\beta$ -blokerlerin ve Hipertrilin farklı koşullar altında (miyokard hasarının biyokimyasal belirteçleri ve integratif parametreler üzerindeki etkisi açısından kronik kalp yetmezliğinin (KKY) doksorubisin modellenmesiyle) karşılaştırmalı bir değerlendirmesinin yapılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** KKY, doksorubisin toplam 15 mg/kg dozunda uygulanarak 190-220 gram ağırlığındaki 85 beyaz fare üzerinde modellenmiştir. Nebivolol (10 mg/kg), karvedilol (50 mg/kg), bisoprolol (10 mg/kg), metoprolol (15 mg/kg) ve Hipertril (3.5 mg/kg) 14 günlük doksorubisin uygulamasından sonra 30 gün boyunca % 1 nişastalı mukus süspansiyonu olarak günde bir kez intragastrik olarak uygulanmıştır. İlaçların kardiyoprotektif etkisi, integratif parametrelerin iyileştirilmesi (sağkalım, kalp kütle indeksi, noktalarındaki şiddet) ve kardiyospesifik belirteçlerin normalleştirilmesiyle (NT-proBNP, D-dimer, eNOS, MB-CPK ve ST2) değerlendirilmiştir.

**Sonuç ve Tartışma:** Hipertril'in tanıtılması, referans ilaçlara kıyasla KKY'li hayvanların ömrünü uzatmakla kalmamış, aynı zamanda erken ölümü önlemiş ve belirtilerin şiddetinin (hidrotoraks, asit, skrotal ödem) azalmasına katkıda bulunmuştur. KKY'li farelere hipertril uygulanması, ölüm oranında azalışa, kalp kitle indeksinde düşüşe ve ayrıca NO-mimetik etki ile önemli kardiyoprotektif etkisine tanıklık eden eNOS ifadesinde bir artışa yol açmıştır. Elde edilen sonuçlar, Hypertril'in temel  $\beta$ -adrenerjik blokerlerin üzerindeki tartışmasız avantajını göstermiştir ve KYY tedavisi için buna dayalı bir ilaç oluşturmak amacıyla deneysel olarak derinlemesine çalışmalar yapılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Bromür 1-( $\beta$ -feniletıl)-4-amino-1,2,4-triazolyum), endotel disfonksiyonu, hipertril, kardiyoproteksiyon, kronik kalp yetmezliği, metoprolol,  $\beta$ -blokerler

## INTRODUCTION

Chronic heart failure (CHF) is one of the alarming problem of modern cardiology worldwide due to its high prevalence, steady increase in the number of cases all over the world, frequent readmissions, poor quality of treatment, high level of disability and mortality of patients, and increased treatment costs [1]. World statistics are disappointing: the current prevalence of clinically significant chronic heart failure in the general population is at least 1.8-2.0%; among people over 65 years of age, the incidence of CHF increases to 6-10%, and decompensation becomes the most frequent cause for hospitalization

[2]. The frequency of patients with asymptomatic left ventricular dysfunction is at least 4 times higher than the number of patients with clinically expressed CHF [3]. Over the past 15 years, the number of hospitalized patients diagnosed with CHF has tripled, and over the past 40 years, the value has increased by 6 times [4]. For over a decade,  $\beta$ -adrenergic blockers have actively been used in the treatment of heart failure. These drugs reduce excessive sympathetic stimulation of the myocardium, desensitize myocardial  $\beta_1$ -adrenoreceptors, reduce the calcium overload of cardiomyocytes, reduce heart's oxygen demand, inhibit lipid peroxidation and stabilize cell membranes, and have an antiarrhythmic effect [5]. The use of  $\beta$ -blockers can improve the survival rates of patients by effectively increasing the ejection fraction and reducing the mass and sphericity of the left ventricle of the heart. Early initiation of pharmacotherapy with  $\beta$ -blockers may prevent/decelerate or even induce reversal of cardiac remodeling [6]. The leading component of this effect of  $\beta$ -blockers is their cardioprotective properties. Drugs such as Metoprolol, Carvedilol, Bisoprolol and Nebivolol are used in CHF. From the standpoint of evidence-based medicine, efficacy in CHF has been confirmed only in some representatives of these classes. Possessing a different set of characteristics, drugs can have variable effect on the survival of patients with CHF and on cardioprotection.

The search for optimal remedies for treating CHF, as well as methods and ways of inhibiting CR, is constantly ongoing. The foregoing served as a rationale for the creation of a new drug of the original structure (bromide 1-( $\beta$ -phenylethyl)-4-amino-1,2,4-triazolium, working title Hypertril) which has NO-mimetic,  $\beta_1$ -adrenergic blocking, antihypertensive, anti-ischemic action and belongs to the class IV of toxicity (LD50 is 683.4 mg/kg with intragastric administration to rats) [7-9]. SPA "Farmatron" together with the scientific and technological complex "Institute of Single Crystals" of the NAS of Ukraine developed a laboratory methods and technological formulas for the synthesis of the substance and the production of ampoule solutions Hypertril substance, for which standardization was carried out (certificate №2, series 020213). According to the decision of the State Expert Center of the Ministry of Health of Ukraine, Phase 1 of clinical trials of Hypertril was permitted, and successfully completed. Hypertril is currently undergoing Phase 2 of the clinical trials as an antihypertensive and antianginal drug.

The aim of the research was to conduct a comparative assessment of the effectiveness of Nebivolol, Carvedilol, Bisoprolol, Metoprolol succinate and a new potential drug "Hypertril" in the conditions of modeling doxorubicin CHF to improve integrative and biochemical parameters.

## MATERIAL AND METHOD

### Animals

The experiments were carried out on 85 white outbred rats weighing 190-220g, obtained from the vivarium of the Institute of Pharmacology and Toxicology of the Academy of Medical Sciences of Ukraine and the Institute of Physiology. A.A. Bogomolets of the Academy of Medical Sciences of Ukraine. The duration of the quarantine (acclimatization period) for all animals was 14 days. During quarantine, each animal was examined daily (behavior and general condition), animals were observed twice a day in cages (morbidity and mortality). Before the start of the study, animals that met the inclusion criteria in the experiment were divided into groups using the randomization method. Throughout the experiment, the animals were observed, death was recorded, and their appearance was described. All manipulations were carried out in accordance with the provisions on the collection of animals for biomedical experiments (Strasbourg, 1986, as amended in 1998) and the "European Applicable Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Scientific Purposes". The protocols of experimental studies and their results were approved by the decision of the Commission on Bioethics of ZSMU (Protocol No. 3 dated March 22, 2021).

### Experimental Model

Doxorubicin model was used to reproduce chronic heart failure [10]. The doxorubicin pharmacological model of CHF could be considered as the most effective, leading to the development of severe and progressive CHF in most animals. The use of doxorubicin (intraperitoneally at a cumulative dose of 15 mg/kg, divided into 6 injections for 14 days) leads to a decrease in left ventricular

myocardial contractility, its eccentric remodeling, and the formation of progressive CHF in rats [10,24,26].

### **Drugs and Pharmacological Agents**

The study used Doxorubicin "Ebeve" 50 mg/25 ml (EBEWE Pharma Ges.mbH Nfg. KG, Austria). All preparations were administered intragastrically once a day in the form of a suspension of 1% starch mucus for 30 days after a 14-day administration of doxorubicin - Hypertril at an experimentally substantiated dose of 3.5 mg/kg [7], Metoprolol succinate - 15 mg/kg [9,11], Nebivolol 10 mg/kg [12], Carvedilol 50 mg/kg [13], Bisoprolol 10 mg/kg [3]. There were 10 animals in the intact group, 20 animals in the control and experimental groups. The following substances were used in the work: Hypertril substance (Scientific and technological complex "Institute of Single Crystals" of the National Academy of Sciences of Ukraine), Metoprolol succinate tablets (Astra Zeneca UK Ltd, Sweden), Nebivolol tablets (Teva Pharmaceutical Industries, Ltd, Israel), Carvedilol tablets (Salutas Pharma GmbH, Germany), Bisoprolol tablets (Teva Pharmaceutical Industries, Ltd, Israel).

### **Anesthesia**

At the end of the experiment, in animals under anesthesia (sodium ethaminal, 40 mg/kg), the heart was taken and weighed, and blood was taken from the abdominal artery with a syringe for biochemical studies.

### **Pharmacological and Physiological Methods**

The animals were examined daily and clinical symptoms of CHF were recorded - hydrothorax, ascites, hepatomegaly, scrotum edema, animal weight, mortality. Motor activity was studied in the open field test (arena with dimensions of 80x80x35cm). The image was captured and recorded using a SSC-DC378P color video camera (Sony, Japan). At the end of the experiment, the heart was taken from the animals, the blood was removed and weighed on an analytical balance AXIS ANG220C.

### **Biochemical and Enzyme Immunoassays Methods**

The blood was centrifuged (3000 rpm, 25 min at 50°C (Eppendorf, Germany). In the blood serum, activity of total CPK (creatine phosphokinase) and cardiac isoenzyme (MB-CPK) is observed according to the High Technology Inc. (USA). Spectrophotometer BioSpectrometer kinetic, Ependorff (Germany). Also, the molecular marker of myocardial damage ST2 protein was determined in the blood serum by the solid-phase immunosorbent sandwich ELISA method using the Critical Diagnostics Presage® ST2 Assay kit (REF# BC-1065). The activity of endothelial NO-synthase (eNOS) was determined in serum by enzyme immunoassay (Cloud-Clone Corporation kit, USA) (#PAA868Ra01), as well as D- dimer (Vector-Best kit, Russia), NT-proBNP (Vector-Best kit, Russia), (enzyme immunoassay analyzer – Immunochem-2200, USA). C-reactive protein was determined by the immunoturbidimetric method (Cormay kit, biochemical analyzer ACCENT-200, Poland).

### **Statistical Methods**

The results of the study were calculated using a standard statistical package «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoftInc., №AXXR712D833214FAN5), «SPSS 16.0» and«Microsoft Office Excell 2003». To determine the presence and nature of the relationship between numerical variables, a regression analysis procedure was used using linear, logarithmic, power, exponential, polynomial (second and third degree) models, achieving an independent (according to the Durbin-Watson criterion), normal distribution of residuals (at the same time as skewness and kurtosis values were used for the goodness of fit criterion. Distribution normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. The data were presented as an average value. The significance of negativity between the mean values was determined by Student's t-test (in the case of a normal distribution). The Mann-Whitney U-test was used in the case of a distribution that is negative compared to normal or analysis of ordinal variables. To compare independent variables in more than two samples, analysis of variance (ANOVA) was used with a normal distribution or the Kruskal-Wallis test for a distribution that was negative from normal. Negativity  $p < 0.05$  (95%) was considered statistically significant for all types of analysis.

## RESULT AND DISCUSSION

The introduction of doxorubicin over the next 14 days (day 45) led to the formation of clinically confirmed heart failure (hydrothorax, ascites, hepatomegaly, scrotal edema occurred in 100% of rats). In the control group, from 1<sup>st</sup> to 45<sup>th</sup> days of observation, 70% of the animals died (Table 1). So, in the control group, 6 rats died on day 20, 4 rats on day 21, 3 rats – on day 27, and 1 – on day 29 of the experiment. In the group of animals with CHF treated with Hypertril at a dose of 3.5 mg/kg intragastrically, 1 rat died on day 40. In the group of animals with CHF treated with Metoprolol at a dose of 15 mg/kg, 3 rats died on day 21, and 1 rat died on day 24, and then 3 rats died on day 32 of observation. On the 29<sup>th</sup> day of observation, 1 rat died in the group of animals treated with Metoprolol. Analysis of the results of treatment of experimental CHF in rats with Hypertril, Metoprolol, Nebivolol, Carvedilol and Bisoprolol indicated that all the studied drugs significantly increased the survival rate of animals, however, during the experiment, when Hypertril was administered, more animals survived. All drugs significantly lengthened the lifespan of rats compared to the control, but by the 45<sup>th</sup> day of the experiment, Metoprolol and Biosprolol increased by 60%, Carvedilol – by 50%, Nebivolol – by 80%, Hypertril – by 95% (Table 1). The use of Hypertril not only prolonged the life of animals compared to the reference drugs, but also prevented early death (3 weeks of observation) of rats with experimental CHF.

**Table 1.** Influence of Hypertril on the survival of animals with CHF at different periods of the experiment

Group of animals	Survival at 21 days	% Survival at 21 days	Survival at 45 days	% Survival at 45 days
Intact	10/10	100	10/10	100
CHF (control)	20/10	50	20/6	30
CHF + Hypertril, 3.5 mg/kg	20/20	100* <sup>1</sup>	20/19	95*
CHF + Metoprolol succinate, 15mg/kg	20/16	80*	20/12	60*
CHF + Bisoprolol, 10 mg/kg	20/15	80*	20/12	60*
CHF + Carvedilol, 50 mg/kg	20/16	80*	20/10	50*
CHF + Nebivolol, 10 mg/kg	20/19	80*	20/16	80*

Note: \* -  $p < 0.05$  is in relation to the indicators of the control group

Observation of animals of the control group showed that they are inactive, the number of motor acts decreased from 34.2 to 17.6. The administration of Hypertril at a dose of 3.5 mg/kg to animals with CHF led to a significant increase in motor activity by 71% on the 21<sup>st</sup> day of observation and by 81% on the 45<sup>th</sup> day. The introduction of studies into comparison did not lead to such an analysis of experimental CHF. The appointment of Hypertril also contributed to a decrease in the number of animals with severe symptoms (hydrothorax, ascites, swelling of the scrotum). So, in this experimental group, only 26% of the animals on the 45<sup>th</sup> day had these signs (against 100% in the control group). In groups of animals treated with metoprolol - 50%, bisoprolol - 42%, carvedilol and metoprolol - 50%, Nebivolol - 31% (Table 2).

The study of the heart mass index (Table 3) shows that myocardial hypertrophy developed in rats with doxorubicin induced CHF, which was recorded on the 45<sup>th</sup> day of the experiment. The index of hypertrophy (percentage of heart weight to animal body weight) in experimental animals increased from  $0.401 \pm 0.015$  to  $0.676 \pm 0.011$  on day 45 ( $p < 0.05$ ). The administration of "Hypertril" slowed down the development of hypertrophy, when this indicator was recorded on the 45<sup>th</sup> day of observation. The heart mass index in the rats treated with Hypertril was  $0.462 \pm 0.022$  and was significantly lower by 31.6% compared to the same indicator in the control group and the group of animals treated with metoprolol

( $0.56 \pm 0.014$ ). Metoprolol and Bisoprolol significantly reduced myocardial hypertrophy in rats with CHF by 17%, Nebivolol by 29%, Carvedilol by 11%.

**Table 2.** The influence of Hypertril on the integrative parameters of animals with CHF at different periods of the experiment

Group of animals	The number of motor acts for 21 days (3 min)	The number of animals with severe CHF symptoms on day 21	The number of motor acts for 45 days (3 min)	The number of animals with severe CHF symptoms on day 45
Intact	3.2±8.5	0	37.3±6.8	0
CHF (control)	17.6±3.4	10/10 (100%)	11.7±2.4	6/6 (100%)
CHF + Hypertril, 3.5 mg/kg	30.1±7.2*	20/4 (20,0%)*	21.2±5.8* (+81%)	19/5 (26%)*
CHF + Metoprolol succinate, 15mg/kg	16.7±5.1	16/6(37,5%)*	12.0±1.4 (+2%)	12/6(50%)*
CHF + Bisoprolol, 10 mg/kg	17.5±6.3	15/6(40%)*	12.8±2.7	12/5(42%)*
CHF + Nebivolol, 10 mg/kg	23.0±4.4	18/5(27,7%)*	18.0±3.5	16/5(31%)*
CHF + Carvedilol, 50 mg/kg	17.2±4.0	16/7(43,7%)*	12.0±3.2	10/5 (50%)

Note: \* -  $p < 0.05$  is in relation to the indicators of the control group

**Table 3.** The effect of Hypertril on body weight and heart mass index of animals with CHF on the 45th day of the experiment

Group of animals	Body weight s on the 1st day, g	Body weight, on the 45th day, g	Weight of the heart on the 45th day, g	Heart mass index on the 45th day
Intact ( $n=10$ )	178.0±6.4	206.5±9.8	0.827±0,036	0.401 ± 0.015
CHF (control) ( $n=6$ )	182.1±6.2	173.6±4.5	1.172±0,012	0.676 ± 0.011
CHF + Hypertril, 3.5 mg/kg ( $n=19$ )	174.2±5.0	177.7±4.0	0.811±0,025	0.462 ± 0.022*
CHF + Metoprolol succinate, 15mg/kg ( $n=12$ )	176.6±5.3	171.0±3.6	0.96±0,025	0.56 ± 0.014*
CHF + Bisoprolol, 10 mg/kg ( $n=12$ )	182.4±6.2	188±4.5	1.065±0,024	0.56± 0.012*
CHF + Nebivolol, 10 mg/kg ( $n=16$ )	188.3±5.7	184.6±5,0	1.020±0.017	0.48± 0.011*
CHF + Carvedilol, 50 mg/kg ( $n=10$ )	189.7±6.2	208.6±6.7	1.246±0.027	0.597± 0.021

Note: \* -  $p < 0.05$  is in relation to the indicators of the control group

When modeling CHF on day 45, a significant increase in the activity of total creatine phosphokinase (CPK) by 1.4 times and cardiospecific creatine phosphokinase (MB-CPK) by 2 times was recorded in the blood serum of experimental animals, which indicateds ischemic damage to the myocardium. The course administration of the studied preparations to rats with CHF led to a decrease in the activity of CPK and MB-CPK. Thus, Hypertril significantly reduced hyperenzymemia of cardiospecific creatine phosphokinase (MB-CPK) by 44%, and hyperenzymemia of total CPK by 24.8%. At the same time, Hypertril is significantly superior to Metoprolol, Bisoprolol and Carvedilol in terms of the degree of decrease in the activity of MB-CPK. Further analysis of biochemical studies of

the blood serum of animals with CHF revealed a significant increase in C-reactive protein by 3.3 times relative to the parameters of the intact group (Table 4). An increase in C-reactive protein indicates the development of an inflammatory response in modeling CHF and the formation of endothelial dysfunction. The appointment of Hypertril to animals with CHF led to a significant decrease in C-reactive protein by 25.5%, and Nebivolol by 19.1% compared with the control group. The introduction of Metoprolol, Carvedilol and Bisoprolol did not affect the level of C-reactive protein in the blood of animals with CHF (Table 5).

**Table 4.** The effect of Hypertril on the activity of creatine phosphokinase and the levels of C-reactive protein in the blood serum of animals with CHF on the 45<sup>th</sup> day of the experiment

Group of animals	MB- CPK, IU / l	Total CPK, IU / l	C-reactive protein, g / l
Intact (n=10)	21.6±2.7	230.2±17.2	1.4±0.12
CHF (control) (n=6)	47.6±3.8	493.6±31.7	4.7±0.38
CHF + Hypertril, 3.5 mg/kg (n=19)	26.7±2.1*	331.8±27.5*	3.5±0.30*
CHF + Metoprolol succinate, 15mg/kg (n=12)	35.8±2.8*	374.5±31.3*	4.7±0.52
CHF + Bisoprolol, 10 mg/kg (n=12)	35.7±3.2*	379.1±27.2*	4.8±0.61
CHF + Nebivolol, 10 mg/kg (n=16)	30.2±2.4*	355.7±24.2*	3.8±0.44*
CHF + Carvedilol, 50 mg/kg (n=10)	34.2±3.1	367.2±45.1*	4.0±0.32

Note: \* - p<0.05 is in relation to the indicators of the control group

**Table 5.** Influence of Hypertril on the content of NT-proBNP, D-dimer, eNOS and ST2 protein in the blood serum of animals with CHF on the 45<sup>th</sup> day of the experiment

Group of animals	NT-proBNP pg/ml	D-dimer ng/ml	eNOS, pg/ml	ST2, ng/ml
Intact (n=10)	201.6±10.0	14.7±0.9	23.3±0.91	20.2±0.6
CHF (control) (n=6)	710.8±13.6	380.8±6.2	8.9±0.30	103.2±2.5
CHF + Hypertril, 3.5 mg/kg (n=19)	218.3±5.4*	14.3±0.9*	73.9±6.58*	23.7±2.6*
CHF + Nebivolol, 10 mg/kg (n=16)	300.0±10.9*	48.8±4.2*	59.3±0.79*	25.5±1.8*
CHF + Bisoprolol, 10 mg/kg (n=12)	353.3±9.9*	160.2±16.6*	19.6±1.27*	32.5±1.0*
CHF + Carvedilol, 50 mg/kg (n=10)	458.5±12.5*	72.1±3.5*	14.7±0.80*	59.9±6.0*
CHF + Metoprolol succinate, 15mg/kg (n=12)	478.0±16.8*	66.8±4.5*	9.3±0.52	62.08±3.2*

Note: \* - p<0.05 in relation to the indicators of the control group

A feature of the development of doxorubicin CHF, unlike other cardiomyopathies, is toxic damage to myocardial mitochondria, which makes the mitochondria a source of reactive oxygen species and pro-apoptotic proteins, and during the deterioration of energy production (a decrease in ATP), activation of oxidative stress, apoptosis is observed [14]. The above mechanisms, realizing their detrimental effect on the heart, ultimately lead to the development of heart failure. A fundamentally important process is the remodeling of the heart. This concept includes: violation of the structure of the contractile apparatus of cardiomyocytes, their functional asymmetry, changes in intercellular interactions, interstitial fibrosis, despiralization of the course of muscle bundles and changes in the shape of the heart cavities. Confirmation that there was a 5-fold increase in cytosol microscopic control of ST2

protein concentration compared to the intact group. ST2 (Suppression of tumorigenicity 2, Growth Stimulation expressed gene 2, stimulating growth factor expressed by gene 2, aka IL1RL1) is a member of the IL-1 receptor superfamily. ST2 is the IL-33 receptor. ST2 - a marker of fibrosis and remodeling of cardiac tissue, released by cardiomyocytes and fibroblasts [15]. An increase in ST2 concentration indicates heart remodeling and the formation of heart failure after 45 days in animals administered with doxorubicin for 14 days. An increase in NT-proBNP by 3.48 times was also recorded, which indicates myocardial damage. Experimental and clinical studies have shown potential markers of heart damage in CHF are circulating atrial and cerebral types of natriuretic peptides (ANP and BNP, respectively), which are elevated in left ventricular dysfunction and heart failure. Levels of these proteins were significantly elevated in the subgroup of patients administered with doxorubicin, who had developed cardiac dysfunction compared to healthy individuals or patients with normal cardiac function [16,17].

We have found that the modeling of CHF by doxorubicin administration led to a 2.6-fold decrease in eNOS activity in the blood of animals compared to the parameters of the intact group, which is an indirect indicator of endothelial dysfunction in this pathology. It is known that during the development of this model of CHF, doxorubicin binds to the eNOS domain, and with an increase in the concentration of doxorubicin, the enzyme do not generate NO, but superoxide, and further suppression of the enzyme expression will occur. Therefore, inhibition of eNOS has far-reaching consequences in the mechanism of decompensated myocardial dysfunction and endothelial dysfunction in CHF [18]. We found an increase in D-dimer by 27 times, which indicates a violation of fibrinolysis and the risk of thrombosis in this model of CHF. Experimental therapy with Metoprolol, Bisoprolol, Nebivolol, Carvedilol and the new drug Hypertril led to a decrease in myocardial damage with varying degrees of effectiveness. Thus, the introduction of Hypertril to rats with CHF led to a decrease in the blood of the main molecular markers of CHF - ST2 and NT-proBNP to the values of intact animals, which indicated its significant cardioprotective effect. Nebivolol competed with Hypertril in the degree of reduction of these markers and reduced the concentration of ST2 by 75.3%, and NT-proBNP by 57.7%. The introduction of Bisoprolol led to a decrease in ST2 and NT-proBNP by 68.4% and 50.3%, respectively. Metoprolol reduced the blood concentration of ST2 and NT-proBNP by 40% and 32%, respectively, Carvedilol provided a decrease in these markers by 41.7% and 35.5%, respectively. Administration of the studied preparations to rats with CHF led to a decrease in D-dimer to varying degrees. However, only in the group of animals treated with a course of Hypertril, this indicator was established at the level of intact animals. We have established an interesting fact of the effect of the studied preparations on the activity of eNOS in the blood of animals with CHF. Thus, the course use of Hypertril leads to a significant increase in eNOS activity - 8.2 times compared with the control group and 3.2 times compared with the intact group, which may indicate the NO-mimetic effect of the drug and its possible endothelioprotective and vasodilation action. Nebivolol also had a positive effect on the activity of eNOS in the blood of animals with CHF - an increase in activity by 6.7 times compared with the control group and 2.5 times compared with the intact group. The introduction of Bisoprolol and Carvedilol had a significant, but much less pronounced effect on eNOS activity in CHF, while Metoprolol did not affect this indicator. The results obtained are in line with our previous studies of cardioprotective effects in various models of heart injury. It is known that Hypertril lowers blood pressure in SHR rats, increases NO production in mitochondria and myocardial cytosol during an increase in eNOS activity and expression [19]. The positive effect of Hypertril on the NO system was accompanied by inhibition of the so-called "parasitic" reactions and their products - cytotoxic derivatives of NO and reduced expression of iNOS [20]. Hypertril reduces the manifestations of mitochondrial dysfunction, which, being an integral aspect of arterial hypertension, contributes to its aggravation by triggering a cascade of molecular and biochemical mechanisms of myocardial damage [7-9]. These mechanisms include disturbances in the L-arginine-NOS-NO system, production of mitochondrial iNOS, oxygen radicals, neutralization of the vasorelaxant effect of NO and its transformation into an active participant in nitrosating stress due to a deficiency of reduced intermediates of the thiol-disulfide system [7,9,14]. It is known that in doxorubicin CHF, Hypertril protects the myocardium and positively affects the morphological and functional parameters of cardiomyocytes, inhibits apoptosis [28]. The  $\beta$ -adrenoblockers studied by us in this work (Carvedilol, Bisoprolol, Metoprolol, Nebivolol) are the main means of standard therapy for heart failure [2,3,5,6]. Demonstrated a decrease in mortality and a certain cardioprotection due to a decrease in



biochemical and molecular markers of heart damage after modeling CHF with doxorubicin. Our data are consistent with those of other investigators who have shown that early use of  $\beta$ -adrenoblockers reduces mortality and improves myocardial contractility in doxorubicin-induced CHF [3,5,6,10,11,12]. However, these studies show that Metoprolol and Bisoprolol,  $\beta$ -adrenoblockers that do not have antioxidant and metabolotropic properties, do not provide significant cardioprotection, like Carvedilol or Nebivolol [22]. Carvedilol (and presumably other  $\beta$ -blockers as well) is known to prevent dissociation of the eNOS dimer [17]. Unlike Metoprolol and Bisoprolol, Carvedilol inhibits cardiomyocyte apoptosis, which plays a leading role in the progression of decompensated myocardial dysfunction. The anti-apoptotic effect is associated with the ability of carvedilol to reduce ROS-dependent expression of Fas and TNF- $\alpha$ . Although the exact mechanism of cardioprotection of these  $\beta$ -adrenoblockers is still poorly understood [12].

World cardiology has accumulated vast experience in the use of  $\beta$ -adrenoblockers in MI. Initially, these drugs were used to limit the area of necrosis, but in this respect they were significantly weaker than thrombolytic therapy or intravenous nitrates. All this served as the basis for identifying the use of  $\beta$ -adrenoblockers in acute myocardial ischemia [23]. Their main mechanism of action is selective binding to  $\beta$ -adrenergic receptors of various organs and tissues, leading to competitive and reversible inhibition of  $\beta$ -adrenoergic stimulation. All  $\beta$ -adrenoblockers are classified into several groups depending on lipo- or hydrophilicity, tropism for  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -,  $\alpha$ -receptors (selectivity), ability to activate  $\beta$ -adrenergic receptors (internal sympathomimetic action), duration of pharmacological action [24]. At the same time, the difference between the drugs in this group is so great that many generally dispute the existence of a “class-effect” in the treatment of major cardiovascular diseases [25]. This is important because in such a situation the transfer of data obtained for one drug to another drug should not be used. The main effects of  $\beta$ -adrenoblockers on the cardiovascular system include: hypotensive, anti-ischemic, antiarrhythmic effects, achieved mainly by reducing the heart rate; slow conduction and increase the refractory period of the components of the conduction system, cardiac output, myocardial oxygen demand, prolongation of the diastole phase, reduced release and formation of the main components of the renin-angiotensin system [26]. Also described are effects such as inhibition of platelet aggregation, apoptosis of cardiomyocytes, prevention of atherosclerotic plaque rupture, antioxidant properties [27]. Recently, data have appeared on the NO-mimetic effect of the  $\beta$ -adrenoblocker Nebivolol and the vasodilatory effect caused by it, as well as on the absence of a depressant effect on the work of the left ventricle [28]. In this regard, a promising direction is the creation of drugs that combine in their mechanism of action  $\beta_1$ -adrenergic blocking and NO-mimetic effects, which will not only positively influence cardiohemodynamics and exercise cardioprotection, but also show additional properties arising from a positive effect on the myocardial nitroxidergic system in CHF.

Thus, the obtained results demonstrated the undoubted advantage of the new original molecule (Hypertril) over the basic  $\beta$ -adrenergic blockers (Metoprolol, Nebivolol, Carvedilol, Bisoprolol) and experimentally substantiate further in-depth study to create a drug based on it for the treatment of CHF.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: I.B., P.B., O.P., N.B.; Design: I.B., P.B., O.P., V.R., A.P. Control: I.B., P.B., O.P., V.R., N.B., A.P.; Sources: I.B., P.B., O.P., V.R., N.B., A.P.; Materials: I.B., P.B., O.P., V.R., N.B.; Data Collection and/or Processing: I.B., P.B., O.P., V.R., N.B.; Analysis and/or Interpretation: I.B., P.B., O.P., V.R., N.B.; Literature Review: I.B., P.B., O.P., A.P.; Manuscript Writing: I.B., P.B., O.P., V.R., N.B., A.P.; Critical Review: I.B., P.B., O.P., V.R., N.B., A.P.; Other: -

## CONFLICT OF INTEREST

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

## ETHICS COMMITTEE APPROVAL

All manipulations were carried out in accordance with the regulation on the use of animals in biomedical experiments (Strasbourg, 1986, amended in 1998). The protocols of experimental studies

and their results were approved by the decision of the Commission on Bioethics of ZSMU (protocol No. 32 of October 26, 2021).

## REFERENCES

1. Bozkurt, B., Coats, A.J., Tsutsui, H., Abdelhamid, C.M., Adamopoulos, S., Albert, N., Anker, S.D., Atherton, J., Böhm, M., Butler, J., Drazner, M.H., Felker, G.M., Filippatos, G., Fiuzat, M., Fonarow, G.C., Gomez-Mesa J.E., Heidenreich, P., Imamura, T., Jankowska, E.A., Januzzi, J., Khazanie, P., Kinugawa, K., Lam, C.S.P., Matsue, Y., Metra, M., Ohtani, T., Piepoli, M.F., Ponikowski, P., Rosano G.M.C., Sakata, Y., Seferovic, P., Starling, R.C., Teerlink, J.R., Vardeny, O., Yamamoto, K., Yancy, C., Zhang, J., Zieroth, S. (2021). Universal definition and classification of heart failure: A report of the Heart Failure Society of America, Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Japanese Heart Failure Society and Writing Committee of the Universal Definition of Heart Failure: Endorsed by the Canadian Heart Failure Society, Heart Failure Association of India, Cardiac Society of Australia and New Zealand, and Chinese Heart Failure Association. *European Journal of Heart Failure*, 23(3), 352-380. [\[CrossRef\]](#)
2. Urbich, M., Globe, G., Pantiri, K., Heisen, M., Bennison, C., Wirtz, H.S., Di Tanna, G.L. (2020). A systematic review of medical costs associated with heart failure in the USA (2014-2020). *Pharmacoeconomics*, 38, 1219-1236. [\[CrossRef\]](#)
3. Watanabe, K., Ohta, Y., Inoue, M., Ma, M., Wahed, M.I., Nakazawa, M., Hasegawa, G., Naito, M., Fuse, K., Ito, M., Kato, K., Hanawa, H., Kodama, M., Aizawa, Y. (2001). Bisoprolol improves survival in rats with heart failure. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 38(1), S55-S58. [\[CrossRef\]](#)
4. Konyakhin, A.Yu. (2009). Modern pathogenetic approaches to the correction of myocardial ischemia. Abstract of the dissertation of the doctor of medical sciences, 47.
5. Wenningmann, N., Knapp, M., Ande, A., Vaidya, T.R., Ait-Oudhia, S. (2019). Insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: Molecular mechanisms, preventive strategies, and early monitoring. *Molecular Pharmacology*, 96(2), 219-232. [\[CrossRef\]](#)
6. Bien, S., Riad, A., Ritter, C.A., Gratz, M., Olshausen, F., Westermann, D., Kroemer, H.K. (2007). The endothelin receptor blocker bosentan inhibits doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cancer Research*, 67(21), 10428-10435. [\[CrossRef\]](#)
7. Mazur, I., Belenichev, I., Kucherenko, L., Bukhtiyarova, N., Puzyrenko, A., Khromylova, O., Gorchakova, N. (2019). Antihypertensive and cardioprotective effects of new compound 1-( $\beta$ -phenylethyl)-4-amino-1, 2, 4-triazolium bromide (Hypertril). *European Journal of Pharmacology*, 853, 336-344. [\[CrossRef\]](#)
8. Mazur, I.A., Belenichev, I.F., Kolesnik, Yu.M., Kucherenko, L. (2010). 1-( $\beta$ -phenylethyl)-4-amino-1,2,4-thiazolium (MT) bromide with cardioprotective, anti-ischemic, antihypertensive, antioxidant, protein syntetic and energy-tropic action. Patent 2404974.
9. Chekman, I.S., Belenichev, I.F., Kucherenko, L.I., Mazur, I.A., Nagornaia, E.A., Bukhtiyarova, N.V. (2013). Parniuk NV. NO-dependent mechanisms of cardioprotective activity of mt preparation during course administration to SHR rats. *Ekspyrymental'naia i Klinicheskaia Farmakologiya*, 76(8), 24-26.
10. Khloponin, D.P. (2009). Analysis of possible mechanisms of pharmacological reversal of cardiac remodeling in chronic heart failure (Doctoral dissertation). Volgograd State Medical University, Volgograd.
11. Sidorov, A.V. (2013). Neurohumoral aspects in the implementation of prognostic effects of  $\beta$ -andreb blockers and ACE in chronic heart failure. Doctoral dissertation. Staraya Kupavna; 412 p.
12. Cosentino, F., Bonetti, S., Rudolf, R., Eto, M., Werner-Felmayer, G., Volpe, M., Lüscher, T.F. (2002). Nitric-oxide-mediated relaxations in salt-induced hypertension: Effect of chronic  $\beta$ 1-selective receptor blockade. *Journal of Hypertension*, 20(3), 421-428. [\[CrossRef\]](#)
13. Chen, Y., Hong, X. (2016). Effects of carvedilol reduce conjunctivitis through changes in inflammation, NGF and VEGF levels in a rat model. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 11(5), 1987-1992. [\[CrossRef\]](#)
14. Kolesnik, Yu.M., Chekman, I.S., Mazur, I.A., Belenichev, I.F., Gorchakova, N.O., Nagorna, O.O. (2014). Mechanisms for the development of endothelial dysfunction and prostate endothelial protectors. *Journal of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine*, 20(3), 289-299.
15. Maisel, A.S., Somma, S.D. (2016). Do we need another heart failure biomarker: Focus on soluble suppression on tumoregencity 2 (sST2). *European Heart Journal*, 38(30), 2325-2333. [\[CrossRef\]](#)
16. Hayakawa, H., Komada, Y., Hirayama, M., Hori, H., Ito, M., Sakurai, M. (2001). Plasma levels of natriuretic peptides in relation to doxorubicin-induced cardiotoxicity and cardiac function in children with cancer. *Medical and Pediatric Oncology*, 37 (1), 4-9. [\[CrossRef\]](#)

17. Octavia, Y., Tocchetti, C.G., Gabrielson, K.L., Janssens, S., Crijns, H.J., Moens A.L. (2012). Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(6), 1213-1225. [\[CrossRef\]](#)
18. Neilan, T.G., Blake, S.L., Ichinose, F., Raheer, M.J., Buys, E.S., Jassal, D.S., Furutani, E., Perez-Sanz, T.M., Graveline, A., Janssens, S.P., Picard, M.H., Scherrer-Crosbie, M., Bloch, K.D. (2007). Disruption of nitric oxide synthase 3 protects against the cardiac injury, dysfunction, and mortality induced by doxorubicin. *Circulation*, 116, 506-514. [\[CrossRef\]](#)
19. Belenichev, I., Gorbachova, S., Pavlov, S., Bukhtiyarova, N., Puzyrenko, A., Brek, O. (2021). Neurochemical status of nitric oxide in the settings of the norm, ischemic event of central nervous system, and pharmacological intervention. *Georgian Medical New*, 315, 169-176.
20. Trujillo, M., Naviliat, M., Alvarez, M.N., Peluffo, G., Radi, R. (2000). Peroxynitrite biochemistry: formation, reactions and detection. *Analisis*, 28(6), 518-527. [\[CrossRef\]](#)
21. Gilleron, M., Marechal, X., Montaigne, D., Franczak, J., Neviere, R., Lancel, S. (2009). NADPH oxidases participate to doxorubicin-induced cardiac myocyte apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388(4), 727-731. [\[CrossRef\]](#)
22. Nicol, M., Sadoune, M., Polidano, E., Launay, J.M., Samuel, J.L., Azibani, F. (2021). Doxorubicin-induced and trastuzumab-induced cardiotoxicity in mice is not prevented by metoprolol ESC Heart Failure, Published online in Wiley Online Library, 8(2), 928-937. [\[CrossRef\]](#)
23. Liu, B., Li, H., Qu, H., Sun, B. (2006). Nitric oxide synthase expressions in ADR-induced cardiomyopathy in rats. *BMB Reports*, 39(6), 759-765. [\[CrossRef\]](#)
24. Belenichev, I.F., Bak, P.G., Abramov, A.V., Kucherenko, L.I., Bukhtiyarova, N.V., Rizhenko, V.P. (2021). ECG analysis in the simulation of chronic heart failure in rats and course administration of a new potential drug "Hypertril". *Pharmacology and Toxicology*, 15(1), 20-30.
25. Tassigny, A., Berdeaux, A., Souktani, R., Henry, P., Ghaleh, B. (2008). The volume-sensitive chloride channel inhibitors prevent both contractile dysfunction and apoptosis induced by doxorubicin through PI3kinase, Akt and Erk 1/2. *European Journal of Heart Failure*, 10(1), 39-46. [\[CrossRef\]](#)
26. Ryzhov, O.A., Ryzhenko, V.P., Levich, S.V., Belenichev, I.F. (2017). Analysis of influence of quantum chemical descriptors on NO-scavenger properties among xanthine derivatives, *Biological Markers and Guided Therapy*, 4(1), 39-48. [\[CrossRef\]](#)
27. Youn, H.J., Kim, H.S., Jeon, M.H., Lee, J.H., Seo, Y.J., Lee, Y.J., Lee, J.H. (2005). Induction of caspase-independent apoptosis in H9c2 cardiomyocytes by adriamycin treatment. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 270(1), 13-19. [\[CrossRef\]](#)
28. Bak, P.G., Belenichev, I.F., Kucherenko, L.I., Abramov, A.V., Khromylova, O.V. (2021). Morpho-functional indicators changes of rats' myocardium in experimental doxorubicin-induced chronic heart failure and its pharmacological modulation with new 4-amino-1,2,4-triazole derivative. *Pharmacia*, 68(4), 919-925. [\[CrossRef\]](#)



# INTEGRATED BIOINFORMATIC ANALYSIS TO EVALUATE TARGET GENES AND PATHWAYS IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

ENTEĞRE BİYOİNFORMATİK ANALİZ İLE KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİDE HEDEF  
GENLERİN VE YOLAKLARIN BELİRLENMESİ

Buket ALTINOK GUNES<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Ankara University, Vocational School of Health Services, Department of Medical Laboratory  
Techniques, 06290, Ankara, Turkey

## ABSTRACT

**Objective:** *The most common type of leukemia, chronic lymphocytic leukemia (CLL), is characterized by progressive accumulation of monoclonal B cells with a specific immunophenotype in the blood, bone marrow, and lymphoid organ. The goal of this research was to use bioinformatic analysis to comprehend the molecular mechanisms causing CLL and to investigate potential targets for the diagnosis and therapy of CLL.*

**Material and Method:** *Expression data from CLL patients with accession numbers GSE22529 and GSE26725 were downloaded from the GEO database for bioinformatic analysis. GSE22529 data was studied with samples from 41 CLL patients and 11 healthy groups, while GSE26725 data was studied with blood samples from 12 CLL patients and 5 healthy groups. GEO2R was used to find differentially expressed genes (DEGs) in CLL patient samples and healthy control samples. The DAVID program was used to perform GO and KEGG enrichment analyses on DEGs. Using the Cytoscape software, a protein-protein interaction (PPI) network was created, and hub genes associated with CLL were identified.*

**Result and Discussion:** *DEGs with  $p < 0.05$  and  $\log_2FC > 0$  were chosen after analysis with GEO2R. In the GSE22529 dataset, 942 genes had higher expression levels in CLL patients compared with controls, while the expression of 1007 genes decreased. In the GSE26725 dataset, CLL patients had lower expression levels for 916 genes compared with controls, while 939 genes showed an increase in expression. 229 DEGs with higher expression levels and 308 DEGs with lower expression levels were found in both sets of data. It has been observed that these common genes, whose expression has changed, are enriched in protein processing in the ER, Chemokine, B-cell receptor, T-cell receptor, protein export pathways. Additionally, DDOST, RPL18, RPL18A,*

\* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Buket Altinok Gunes  
**e-mail / e-posta:** baltinok@ankara.edu.tr, **Phone / Tel.:** +903123573242/6642

*RPL19, RPL31, GNB3, GNB4, GNG11, GNGT1, NEDD8, UBE2M RBX1, FBXO21, SKP1, KLHL9 and CAND1 were identified as the most important genes. Our study's findings demonstrated that newly discovered genes and pathways may be candidates for CLL biomarkers that can be used for both the diagnosis and drug treatment of the disease.*

**Keywords:** Bioinformatic analysis, CLL, GEO, microarray, network module

## ÖZ

**Amaç:** *En yaygın lösemi türü olan kronik lenfositik lösemi (KLL), kanda, kemik iliğinde ve lenfoid organda spesifik bir immünofenotipe sahip monoklonal B hücrelerinin ilerleyici birikimi ile karakterize edilir. Bu çalışmanın amacı, biyoinformatik analiz yaparak KLL'nin altında yatan moleküler mekanizmaları araştırmak, KLL tanı ve tedavisi için potansiyel hedefleri belirlemektir.*

**Gereç ve Yöntem:** *Biyoinformatik analiz için GEO veri tabanından KLL hasta verilerine ait GSE22529 ve GSE26725 erişim numaralarına sahip ekspresyon dataları indirildi. GSE22529 numaralı data 41 KLL hasta ve 11 sağlıklı gruptan, GSE26725 numaralı data ise 12 KLL ve 5 sağlıklı gruptan alınan kan örnekleri ile çalışılmıştır. KLL hasta örnekleri ile sağlıklı kontrol örnekler farklı şekilde ifade edilen genleri (DEGs) bulabilmek için GEO2R ile analiz edildi. DEG'ler için DAVID programı kullanılarak GO ve KEGG zenginleştirme analizleri gerçekleştirildi. Cytoscape yazılımı kullanılarak protein-protein etkileşim (PPI) ağı oluşturuldu ve KLL ile ilişkili önemli genler tesbit edildi.*

**Sonuç ve Tartışma:** *GEO2R ile analiz sonrası  $p < 0.05$  ve  $\log_2FC < 0$ ,  $\log_2FC > 0$  olan DEG'ler seçildi. GSE22529 veri setinde KLL hastalarında kontrol grubuna göre 942 genin ifadesi artmış, 1007 genin ifadesi azalmıştır. GSE26725 veri setinde ise KLL hastalarında kontrol grubuna göre 939 genin ifadesi artmış, 916 genin ifadesi azalmıştır. Her 2 veri seti için ortak olarak ifadesi artan 229, ifadesi azalan 308 DEG tanımlanmıştır. İfadesi değişen bu ortak genlerin ER'de protein işlenmesi, kemokin, B-hücre reseptör, T-hücre reseptör, protein taşıma gibi yolaklarda zenginleştiği görülmüştür. Buna ek olarak DDOST, RPL18, RPL18A, RPL19, RPL31, GNB3, GNB4, GNG11, GNGT1, NEDD8, UBE2M RBX1, FBXO21, SKP1, KLHL9 and CAND1 en önemli genler olarak belirlenmiştir. Çalışmamızın sonucu, ortaya çıkan genlerin ve yolakların KLL'nin tanısında ve ilaç tedavisinde kullanılabilecek birer biyobelirteç adayı olabileceğini göstermiştir.*

**Anahtar Kelimeler:** Ağ modülü, biyoinformatik analiz, GEO, KLL, mikrodizin

## INTRODUCTION

In western countries, chronic lymphocytic leukemia is the most common type of leukemia (CLL). And more than 15,000 new cases have been reported, with approximately 4500 deaths. The average diagnosed age is 72. Men suffer more than women [1,2]. A characteristic of CLL, a clonal proliferative tumor of mature CD5-positive B lymphocytes, is an expansion of lymphocytes in the bone marrow, lymph nodes, spleen, and peripheral circulation [2]. Unfortunately, it is still unclear how CLL develops at the molecular level, which prevents early diagnosis and prompt treatment. The molecular mechanism and biomarkers of CLL development have thus been the main focus of CLL research in order to increase the probability of a disease identification and course of treatment. Many genes and cellular networks have been shown to influence the origin and progression of CLL, according to studies. Computer-based technologies, such as molecular dynamics simulation, have advanced quickly in recent years, leading to the progressive discovery of novel molecular causes of the disease. The combination of web-based systems like GEO (Gene Expression Omnibus), DAVID, data mining techniques (cancergenome.nih.gov), and computer-based analysis methods has led to the discovery of many highly sensitive and specific markers [3-6]. Gene chips are frequently used as a gene detection technology and relevant data are kept in public databases. This genomic data can be integrated and reanalyzed to potentially find specific disease-related biomarkers [7]. In clinical research applications like categorization, prognosis prediction and the identification of novel targeted therapies, the use of high-throughput platforms in gene expression has become increasingly important recently [8-10].

The original gene microarray datasets (GSE22529 and GSE26725) used in this study were obtained from the NCBI-GEO (National Center for Biotechnology Information-Gene Expression Omnibus database). Differentially expressed genes (DEGs) were identified in these samples by comparing CLL patient and control samples using R software and Bioconductor. To determine the

functional enrichment analysis of DEGs, the DAVID software program was used to analyze the Gene Ontology (GO), Kyoto gene and genome encyclopedia (KEGG) pathway and protein-protein interaction (PPI) network [11].

The novel biomarkers and pathways found in this study are predicted to provide information on possible molecular mechanisms underlying CLL. The newly discovered key targets will provide new suggestions and approaches for CLL early detection and individualized treatment.

## MATERIAL AND METHOD

### Affymetrix Microarray Data

We scanned the GEO database for the transcriptome datasets of patients with CLL. The National Center for Biotechnology Information's-Gene Expression Omnibus (NCBI-GEO), a freely accessible database of functional genomics, was used to download microarray datasets with accession numbers GSE22529 and GSE26725. 41 CLL patients and 11 control blood samples were included in the study with the accession number GSE22529 that was performed on the Affymetrix Human Genome U133A Array platform [HG-U133A]. Additionally, 12 CLL patients and 5 control blood samples were included in the study with accession number GSE26725 that was conducted on the Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array platform [HG-U133 Plus 2]. The platforms used along with the patient and control numbers are listed in Table 1.

**Table 1.** Microarray platforms

<b>GEO access number</b>	<b>CLL Patient number</b>	<b>Control number</b>	<b>Platform</b>
<b>GSE 22529</b>	41	11	[HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array
<b>GSE26725</b>	12	5	[HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
<b>Total</b>	<b>53</b>	<b>16</b>	

### Identification of DEG Analysis

To find differentially and co-expressed genes in the two datasets for the analysis of differential expression, the online analysis program GEO2R was utilized. A global public resource for high-throughput microarray and next-generation array functional genomic datasets is called GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). This data is supplied by the research community. GEO2R is an R-based web application that analyzes GEO data and allows users to compare different groups to calculate "DEG" [12]. On the preprocessed microarray data, the log<sub>2</sub> fold change (log<sub>2</sub>FC) was calculated. t-tests were used to compute p-values and adjusted p-values. p < 0.05 and |log<sub>2</sub>FC| > 0 criteria were considered for significant DEG screening. DEGs were screened and ranked by importance. Up-regulated genes (log<sub>2</sub>FC > 0) and down-regulated (log<sub>2</sub>FC < 0) were classified on the basis of the fold change. The intersection of two datasets was used to create a Venn diagram using the online tool Venny 2.1 and determine commonly varying DEGs. DEGs that were statistically significant in both datasets were compared, and common DEGs were used in the study's subsequent analysis.

### Gene Ontology (GO) and Pathway Enrichment Analyses

DAVID 6.8 was used to carry out the functional enrichment analysis of common DEGs. ([david.abcc.ncifcrf.gov/](http://david.abcc.ncifcrf.gov/)). An online tool for high-throughput analysis of gene function derived from genomic experiments is called Annotation, Visualization and Integrated Discovery Database (DAVID) [13]. Functional categories, Gene Ontology (GO) terms, and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genes

(KEGG) pathways are all analyzed using DAVID. To predict the functions of proteins, GO analysis was divided into three categories: biological process (BP), cellular component (CC), and molecular function (MF). To create networks of molecular interactions, reactions, and associations, A KEGG pathway analysis was utilized to locate sets of DEGs in relation to particular pathways [14]. A statistically significant difference was defined as  $p < 0.05$ .

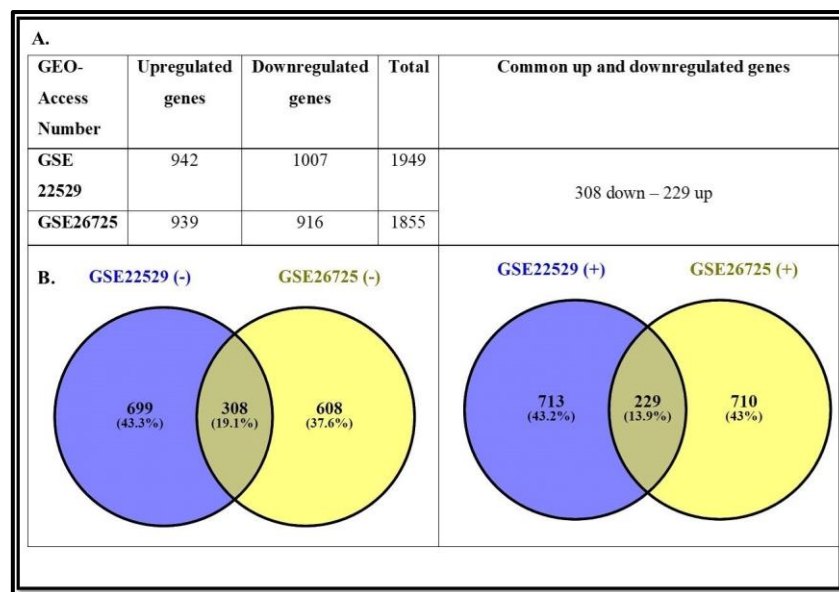
### Construction of Protein-protein Interaction Network (PPI) and Hub Gene Screening

A database of confirmed and expected protein-protein connections called STRING (<https://string-db.org>) was used to analyze PPI networks. These connections involve functional and physical relationships, and data for these interactions are primarily derived from common expression networks, automated text mining, high-throughput experiments, and computational predictions. DEGs were mapped to the PPI network with a threshold of  $>0.9$  interaction score. Furthermore, the PPI network was visualized and created using Cytoscape v3.6.0 software. Hub nodes were those nodes that had the most communication with their neighbors. The gene network clustering analysis was carried out using the Cytoscape software package's MCODE application to determine important PPI network modules. Cutoff degree = 2, node score cutoff = 0,2, k-core=2, and maximum depth=100 are the qualifying criteria for MCODE functional modules.

## RESULT AND DISCUSSION

### DEG Analysis and Identification of Common DEGs

Genes with  $p < 0.05$  and  $|\log_2 FC| > 0$  were chosen because of transcriptome analyses in the GSE22529 and GSE26725 datasets. The expression of 1949 genes changed (942 increased-1007 decreased) in the GSE22529 dataset, while the expression of 1855 genes changed (939 increased-916 decreased) in the GSE26725 dataset. When the DEGs found in both datasets were compared, 537 genes with co-variation corresponding to protein-coding genes were discovered; 308 of them showed decreased expression and 229 showed increased expression, indicating that they were expressed in the same direction in both data sets. Figure 1A shows the most increasing and decreasing gene lists from the data of common DEGs. In both datasets, the differential expression of common DEGs, gene counts, and venn diagrams in CLL patients compared with controls are displayed in Figure 1A and 1B. ( $p < 0.05$  and  $|\log_2 FC| > 0$ ). In Figure B, different color regions indicate different microarray data profiles.



**Figure 1.** Venn diagrams of common DEGs of GEO datasets

Tables 2 and 3 list the 20 genes with the highest increase and decrease in both the data sets.

**Table 2.** The top 20 upregulated and downregulated genes for GSE22529

Gen	log <sub>2</sub> (FC)	Gen	log <sub>2</sub> (FC)
<b>FMOD</b>	5.61	<b>IGLJ3</b>	-6.787
<b>FRY</b>	4.409	<b>S100A8</b>	-6.758
<b>ABCA6</b>	4.409	<b>FOS</b>	-6.241
<b>ARHGAP44</b>	4.321	<b>LYZ</b>	-5.874
<b>IGFBP4</b>	4.255	<b>FCN1</b>	-5.708
<b>ROR1</b>	4.092	<b>S100A9</b>	-5.589
<b>COL9A2</b>	3.581	<b>IGHV4-31</b>	-5.521
<b>TTN</b>	3.549	<b>HBB</b>	-5.358
<b>SPATS2L</b>	3.542	<b>IGHV3-23</b>	-5.228
<b>SERPINF1</b>	3.535	<b>IGHD</b>	-5.221
<b>INPP5F</b>	3.307	<b>CD14</b>	-5.122
<b>PHTF1</b>	3.222	<b>HBA2//HBA1</b>	-5.115
<b>DMD</b>	3.205	<b>MLIP</b>	-5.002
<b>COL9A3</b>	3.103	<b>CSGALNACT1</b>	-4.947
<b>CCDC88A</b>	3.027	<b>CST3</b>	-4.843
<b>VIPR1</b>	3.022	<b>CEBPD</b>	-4.76
<b>SGPP1</b>	2.982	<b>SORL1</b>	-4.719
<b>NOSIP</b>	2.94	<b>ITGB2</b>	-4.401
<b>LEF1</b>	2.911	<b>HCK</b>	-4.21
<b>PDGFD</b>	2.782	<b>SERPINA1</b>	-4.117

**Table 3.** The top 20 upregulated and downregulated genes for GSE26725

Gen	log <sub>2</sub> (FC)	Gen	log <sub>2</sub> (FC)
<b>ABCA6</b>	5.113	<b>IGLJ3</b>	-6.592
<b>PIGR</b>	4.839	<b>JCHAIN</b>	-5.441
<b>ARHGAP44</b>	4.414	<b>SCN3A</b>	-5.069
<b>PHEX</b>	4.286	<b>BMS1P20</b>	-5.007
<b>ENPP2</b>	4.216	<b>SSPN</b>	-4.777
<b>CLNK</b>	4.034	<b>IGLL5</b>	-4.777
<b>CCDC88A</b>	3.879	<b>TSPAN13</b>	-4.643
<b>IL17RB</b>	3.863	<b>IGK//IGKC</b>	-4.486
<b>ROR1</b>	3.827	<b>IGHM</b>	-4.436
<b>SPATS2L</b>	3.478	<b>PPP1R14A</b>	-4.25
<b>ADTRP</b>	3.295	<b>MLIP</b>	-4.219
<b>ABCA9</b>	3.165	<b>PTPRK</b>	-3.934
<b>MIR155</b>	3.067	<b>CORO2B</b>	-3.815
<b>FILIP1L</b>	3.044	<b>NRIP1</b>	-3.58
<b>AKAP12</b>	2.748	<b>TSPYL5</b>	-3.579
<b>LRRN1</b>	2.736	<b>IGKV1OR2</b>	-3.554
<b>IGSF3</b>	2.711	<b>CST3</b>	-3.458
<b>SGSM1</b>	2.706	<b>CD1C</b>	-3.423
<b>KSR2</b>	2.658	<b>BHLHE41</b>	-3.348
<b>RAPGEF3</b>	2.653	<b>SLC38A11</b>	-3.336



## GO and KEGG Pathway Analysis of DEGs

In our study, functional and pathway enrichment analyses of DEGs, which are common expressions in both data sets, were performed using DAVID software. Down-regulated DEGs were found in 14 clusters (enrichment Score>1.3) and were highly enriched in various aspects in the 'molecular function (MF),' 'biological process (BP),' and 'cellular component (CC)' groups, according to GO analysis. Up-regulated DEGs were found in only two clusters (enrichment Score >1.3): molecular function (MF) and biological process (BP). Table 4 shows GO terms enriched with  $p < 0.05$  and a list of up-regulated genes. According to KEGG pathway analyses, down-regulated genes were significantly enriched in 10 pathways, particularly "Protein processing in the endoplasmic reticulum, Chemokine signaling pathway, hematopoietic cell lineage, transcriptional misregulation in cancer," whereas upregulated genes were enriched in 3 pathways (Table 5).

**Table 4.** GO analysis of common DEGs in CLL

Downregulated Genes			
Category	Pathways	Count	Pvalue
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006468~protein phosphorylation	20	5.88852E-05
	GO:0045087~innate immune response	13	0.0287027
	GO:0098609~cell-cell adhesion	12	0.0026174
	GO:0002250~adaptive immune response	10	0.0003895
	GO:0006958~complement activation, classical pathway	8	0.0007098
	GO:0050776~regulation of immune response	8	0.0177295
	GO:0038095~Fc-epsilon receptor signaling pathway	8	0.0177295
	GO:0050853~B cell receptor signaling pathway	7	0.000148
	GO:0006486~protein glycosylation	6	0.0273621
	GO:0042110~T cell activation	6	0.0006589
GO:0050871~positive regulation of B cell activation	5	0.0005624	
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005913~cell-cell adherens junction	15	0.0003103
	GO:0005856~cytoskeleton	14	0.0033875
	GO:0034663~endoplasmic reticulum chaperone complex	4	0.0004703
	GO:0042571~immunoglobulin complex, circulating	4	0.0025327
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005524~ATP binding	33	0.0281698
	GO:0003779~actin binding	16	2.25E-05
	GO:0004674~protein serine/threonine kinase activity	15	0.0018041
	GO:0098641~cadherin binding involved in cell-cell adhesion	13	0.0015797
	GO:0003823~antigen binding	7	0.0047291
	GO:0016757~transferase activity, transferring glycosyl groups	7	0.0003103
	GO:0034987~immunoglobulin receptor binding	6	3.84E-05
GO:0035091~phosphatidylinositol binding	6	0.0093082	
Upregulated Genes			
Category	Pathways	Count	Pvalue
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0016569~covalent chromatin modification	7	0.0025089
	GO:0035335~peptidyl-tyrosine dephosphorylation	5	0.0320941
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0042393~histone binding	9	0.0001137
	GO:0004725~protein tyrosine phosphatase activity	5	0.0325846

**Table 5.** KEGG pathway analysis of common DEGs in CLL

DEGs	Term ID	Description	Count	Pvalue
Down-regulated	hsa04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	13	8.85E-05
	hsa04062	Chemokine signaling pathway	10	0.0092848
	hsa04640	Hematopoietic cell lineage	8	0.0013335
	hsa05202	Transcriptional misregulation in cancer	8	0.0411960
	hsa04662	B cell receptor signaling pathway	7	0.0019847
	hsa05221	Acute myeloid leukemia	6	0.0042073
	hsa04666	Fc gamma R-mediated phagocytosis	6	0.0222590
	hsa04660	T cell receptor signaling pathway	6	0.0427175
	hsa04720	Long-term potentiation	5	0.0374360
	hsa03060	Protein export	4	0.0092373
Up-regulated	hsa03013	RNA transport	7	0.0202688
	hsa04071	Sphingolipid signaling pathway	6	0.0168503
	hsa00071	Fatty acid degradation	4	0.0152482

### Integrated Protein-protein Interaction (PPI) Network

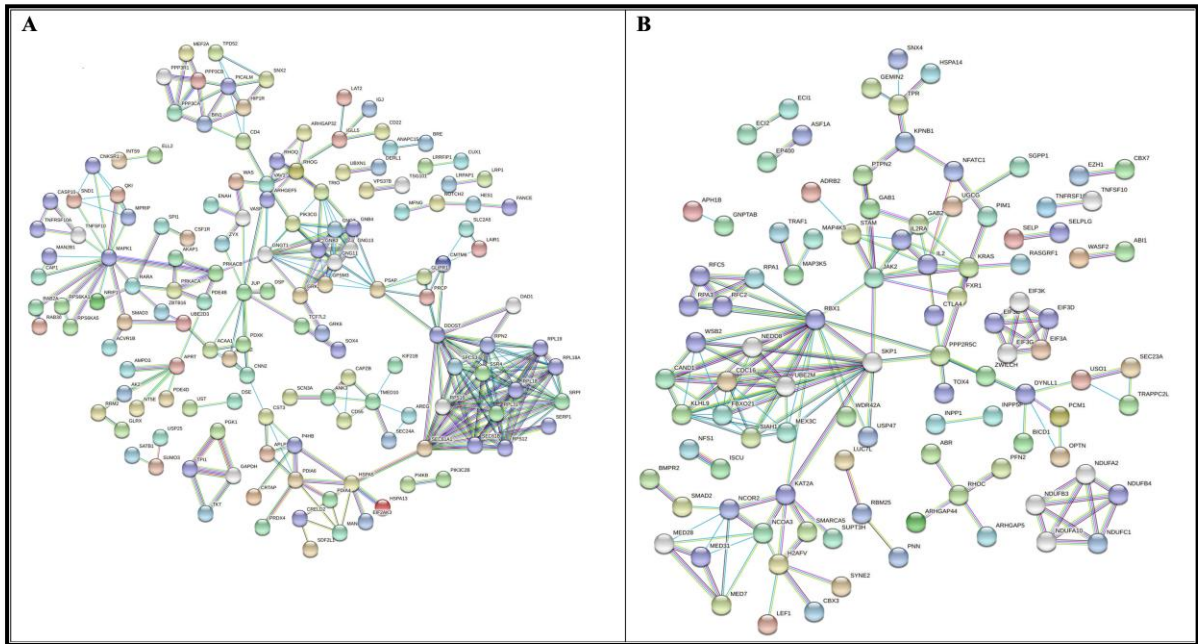
In a comparison of both datasets, the PPI network structure of down-regulated and up-regulated genes in common was studied using the STRING database. The gene interaction network in down-regulated genes contains 290 nodes and 297 edges, according to the PPI analysis. DEGs are symbolized by nodes, while interactions between DEGs are symbolized by edges (Fig 2A). The STRING analysis showed that CASP10-TNFRSF10A interacted at the highest confidence interval. These genes were analyzed using Network Analyzer in Cytoscape software and the core genes were ranked based on their predicted scores. *DDOST*, *MAPK1*, *RPL18*, *RPL18A*, *GNB3*, *RPL19*, *GNB4*, *RPL31*, *GNG11*, *GNGT1* genes are the top 10 high order hub nodes. These genes were down-regulated. Among these genes, *DDOST* has the highest node degree (=15). PPI analysis of up-regulated genes resulted in 239 nodes and 173 edges in the gene interaction network (Fig 2B). The top 10 hub nodes with high order in the upregulated genes are the genes *RBX1*, *SKP1*, *UBE2M*, *FBXO21*, *KLHL9*, *JAK2*, *IL2*, *KRAS*, *CAND1*, *NEDD8*. The *RBX1* gene has the highest node degree (=19) among these genes. MCODE was then used in Cytoscape software to screen the gene interaction network modules, and Figures 3A-3B show the 4 modules with the highest MCODE score.

In this study, we compared the expression of 2 microarray datasets including CLL patients and healthy controls to identify Differentially Expressed Genes (DEG). On the basis of the gene expression profile, we discovered 537 common DEGs (229 up and 308 down). Then, we investigated these DEGs thoroughly using bioinformatics techniques, such as GO and KEGG pathway enrichment studies, PPI network analysis, and hub gene selection (Fig 2, 3).

It has been indicated that the genes whose expression changes are grouped in ER protein processing, chemokine signaling, hematopoietic cell lineage, transcriptional dysregulation in cancer, and B cell receptor signaling pathways, RNA transport, Sphingolipid signaling, and fatty acid degradation pathways.

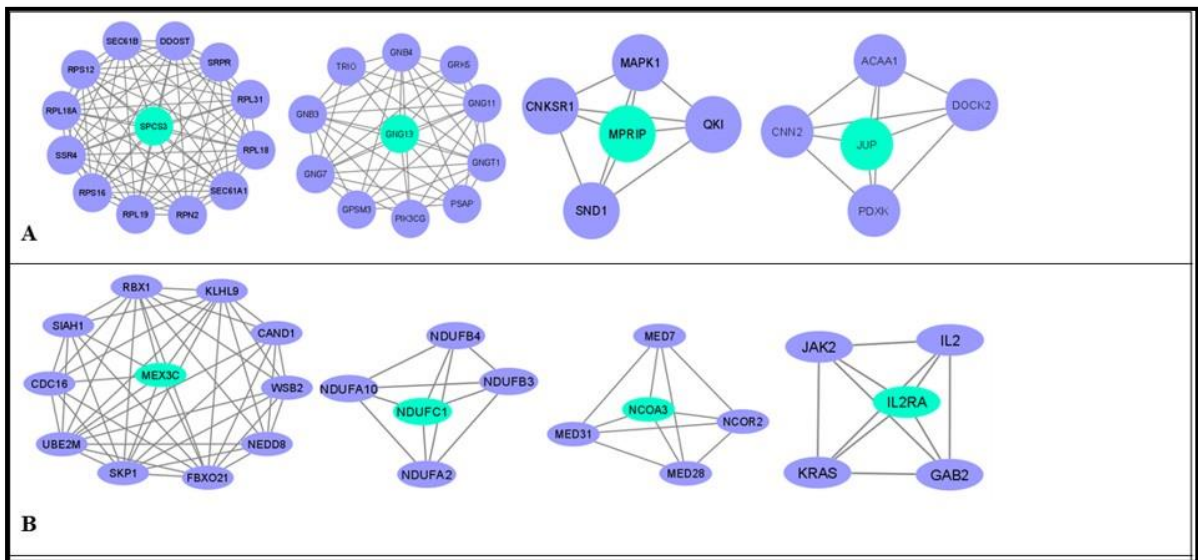
One of the significant post-translational changes of proteins known as glycosylation is essential for many cellular biological functions and is closely linked to a variety of pathological occurrences, such as the development of tumors and inflammatory reactions. Polysaccharides or glycoproteins associated with tumors may result from changes in glycosylation, which may act as tumor markers and impact the development and prognosis of tumors. *DDOST* (dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase) encodes a protein that is involved in the N-glycosylation of proteins and is a part of the oligosaccharide transferase (OST) complex [15]. Some researchers have shown that patients with skin squamous cell carcinomas that express a high percentage of *DDOST* have a bad prognosis [16]. Additionally, studies have revealed that *DDOST* is a separate prognostic factor in people with liver

cancer [17]. For the first time, DDOST, which has the highest degree of node among the hub genes with dramatically decreased expression and is enriched in the protein processing in the ER pathway, was linked to CLL in our study.



**Figure 2:** The protein interaction network (PPI) of identified genes.

A. Downregulated genes, Upregulated genes. Circle define DEGs, lines show protein interaction between DEGs.



**Figure 3:** The top modules from the gene-gene interaction network of common DEGs.

A. Downregulated genes, B. Upregulated genes

The B cell receptor signaling pathway and related MAPK (mitogen-activated protein kinase) signaling are among the signaling pathways that are activated in the microenvironment of CLL by a

various stimulus. This illustrates the correlation between the control of the cell cycle, cell proliferation, and the instability of cancer cells, which is associated with the growth and spread of cancer cells [18]. In our research, the B cell receptor signaling pathway had enriched and differently elevated MAPK1 levels.

The ribosomal protein family (RP) is the other group in which the key genes in our study whose expression is lowered in CLL patients. Deficiencies in the ribosome biogenesis pathway are associated with an increased risk of having cancer since the ribosome is critical for the development of disorders [19]. Recent findings of somatic mutations in RP genes in hematological cancers (including T-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL), chronic lymphocytic leukemia (CLL), and multiple myeloma) and solid tumors (such as breast cancer and melanoma) raise the potential that abnormalities in ribosome synthesis could facilitate oncogenic transformation. Additionally, RP gene deletions are extremely common in human malignancies [20]. The RPL18, RPL18A, RPL19, and RPL31 genes were discovered to be related to CLL for the first time in our study.

Another key pathway in our study was the chemokine signaling pathway. The development and longevity of CLL are largely dependent on relations with the tissue microenvironment. Nurselike cells (NLCs) produced from monocytes, mesenchymal stromal cells (MSCs), T cells, and NK cells are essential part of the microenvironment. These cells interact with CLL cells via a complex network of adhesion molecules, chemokine receptors, TNF family members, and soluble factors. In the literature, it has been established that aberrant chemokine receptor (CCR1, CCR3, CCR7, CX3CR1, CXCR3, CXCR4, and CXCR5 gene expression levels raised, SIPR1 gene expression level decreased) in leukemic cells isolated from CLL patients play a crucial part in the etiology of the disease. These findings demonstrated how the aberrant spread of leukemic cells' localized supported their survival by the microenvironment [21]. The expression of the chemokine pathway genes GNB3, GNB4, GNG11, and GNGT1 was shown to be downregulated in patients with CLL in our study.

One of the molecular mechanisms that strictly regulates hematopoiesis is the ubiquitin proteasome system. It is a type of post-translational modification, which refers to a change in a protein after a cell makes it. Malignancies in leukemia types can result from this mechanism dysregulation. A recent study has revealed that CLL has an increased in ubiquitin-like alterations, with numerous proteins in pertinent pathways being implicated [22]. Studies have shown that the prognostic biomarkers for AML are NEDD8, UBE2M and RBX1 [23]. In our study, we discovered that CLL patients had significantly higher expression levels of the genes for the ubiquitin-like proteins NEDD8, UBE2M, RBX1, FBXO21, SKP1, KLHL9, and CAND1.

One of the most studied and significant pathways in carcinogenesis and cancer maintenance is JAK/Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) signaling. This pathway participates in the control of differentiation, proliferation, migration, survival, or cytotoxicity in response to more than 50 cytokines, growth factors, and hormones, depending on cell type, developmental stage, and microenvironment. Recent research has demonstrated that CLL cells had overexpressed JAK2 compared with healthy B lymphocytes [24]. The results of our investigation were consistent with the literature in that we discovered that JAK2 gene expression levels considerably increased in patients with CLL. The main cytokine IL-2, which has immunomodulatory effects on the immune system and induces STAT4 and JAK2 activation in NK cells, was also found to be overexpressed in the CLL patients in our research.

The KRAS gene, a member of the RAS family, is another key gene in our study. The Ras genes are among the oncogenes that are most frequently activated in cancer. On the inner side of the plasma membrane, RAS proto-oncogenes like KRAS, NRAS, and HRAS serve as molecular switches that transmit extracellular signals to the nucleus. They regulate the growth and differentiation of numerous different cell types [25]. RAS mutations have been extensively investigated in many leukemia types, but the study with patients with AML indicated that KRAS expression increased in AML independently of the mutation. In our study, it was observed that KRAS expression levels were elevated in CLL patients.

In conclusion, this study's findings suggest that DDOST, RPL18, RPL18A, RPL19, RPL31, GNB3, GNB4, GNG11, GNGT1 genes might be linked to CLL. The current research may be useful in

understanding the molecular mechanisms underlying CLL and identifying new biomarkers that may be drug targets. Although drug response rates are high in patients treated with immune therapy and targeted agents in CLL, the mechanisms leading to the relapse of the disease in a significant proportion of patients are still not fully elucidated. Therefore, more studies are needed on the key genes and pathways associated with CLL.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

## CONFLICTS 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. Yan, H., Tian, S., Kleinstern, G., Wang, Z., Lee, J.H., Boddicker, N.J., Cerhan, J.R., Kay, N.E., Braggio, E., Slager, S.L. (2020). Chronic lymphocytic leukemia (CLL) risk is mediated by multiple enhancer variants within CLL risk loci. *Human Molecular Genetics*, 29(16), 2761-2774. [\[CrossRef\]](#)
2. Hallek, M. (2019). Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematology*, 94(11), 1266-1287. [\[CrossRef\]](#)
3. Gao, C., Zhou, C., Zhuang, J., Liu, L., Wei, J., Liu, C., Huayao, Li, H., Sun, C. (2019). Identification of key candidate genes and miRNA-mRNA target pairs in chronic lymphocytic leukemia by integrated bioinformatics analysis. *Molecular Medicine Reports*, 19, 362-374. [\[CrossRef\]](#)
4. Luo, P., Yang, Q., Cong, L.L., Wang, X.F., Li, Y.S., Zhong, X.M., Xie, R.T., Jia, C.Y., Yang, H.Q., Li, W.P., Cong, X.L., Xia, Q., Fu, D., Zeng, Q.H., Ma, Y.S. (2017). Identification of miR124a as a novel diagnostic and prognostic biomarker in nonsmall cell lung cancer for chemotherapy. *Molecular Medicine Reports*, 16, 238-246. [\[CrossRef\]](#)
5. Kamaraj, B., Gopalakrishnan, C., Purohit, R. (2014). In silico analysis of miRNA-mediated gene regulation in OCA and OA genes. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 70, 1923-1932. [\[CrossRef\]](#)
6. Zhang, Y., Han, X., Wu, H., Zhou, Y. (2017). Bioinformatics analysis of transcription profiling of solid pseudopapillary neoplasm of the pancreas. *Molecular Medicine Reports*, 16, 1635-1642. [\[CrossRef\]](#)
7. Yan, H., Zheng, G., Qu, J., Liu, Y., Huang, X., Zhang, E., Cai, Z. (2019). Identification of key candidate genes and pathways in multiple myeloma by integrated bioinformatics analysis. *Journal of Cellular Physiology*, 234(12), 23785-23797. [\[CrossRef\]](#)
8. Bustin, S.A., Dorudi, S. (2004). Gene expression profiling for molecular staging and prognosis prediction in colorectal cancer. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 4, 599-607. [\[CrossRef\]](#)
9. Nannini, M., Pantaleo, M.A., Maleddu, A., Astolfi, A., Formica, S., Biasco, G. (2009). Gene expression profiling in colorectal cancer using microarray technologies: results and perspectives. *Cancer Treatment Reviews*, 35, 201-209. [\[CrossRef\]](#)
10. Kulasingam, V., Diamandis, E.P. (2008). Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nature Clinical Practice Oncology*, 5, 588-599. [\[CrossRef\]](#)
11. Gao, C., Zhou, C., Zhuang, J., Liu, L., Wei, J., Liu, C., Li, H., Sun, C. (2019). Identification of key candidate genes and miRNA-mRNA target pairs in chronic lymphocytic leukemia by integrated bioinformatics analysis. *Molecular Medicine Reports*, 19(1), 362-374. [\[CrossRef\]](#)
12. Barrett, T., Wilhite, S.E., Ledoux, P., Evangelista, C., Kim, I.F., Tomashevsky, M., Marshall, K.A., Phillippy, K.H., Sherman, P.M., Holko, M., Yefanov, A., Lee, H., Zhang, N., Robertson, C.L., Serova, N., Davis, S., Soboleva, A. (2013). NCBI GEO: archive for functional genomics data sets-update. *Nucleic Acids Research*, 39(1), D1005-D1010. [\[CrossRef\]](#)
13. Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C.,

- Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., Sherlock, G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics*. 25, 25-29. [\[CrossRef\]](#)
14. Kanehisa M., Goto S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28, 27-30. [\[CrossRef\]](#)
  15. Chang, X., Pan, J., Zhao, R., Yan, T., Wang, X., Guo, C., Yang, Y., Wang, G. (2022). DDOST Correlated with Malignancies and Immune Microenvironment in Gliomas. *Frontiers in Immunology*, 13, 1-13. [\[CrossRef\]](#)
  16. Shapanis, A., Lai, C., Smith, S., Coltart, G., Sommerlad, M., Schofield, J., Parkinson, E., Skipp, P., Healy, E. (2021). Identification of Proteins Associated With Development of Metastasis From Cutaneous Squamous Cell Carcinomas (cSCCs) via Proteomic Analysis of Primary cSCCs. *British Journal of Dermatology*, 184(4), 709-721. [\[CrossRef\]](#)
  17. Zhu, C., Xiao, H., Jiang, X., Tong R., Guan, J. (2021). Prognostic Biomarker DDOST and Its Correlation With Immune Infiltrates in Hepatocellular Carcinoma. *Frontiers in Genetics*, 12, 1-13. [\[CrossRef\]](#)
  18. Gao, C., Zhou, C., Zhuang, J., Liu, L., Wei, J., Liu, C., Li, H., Sun, C. (2019). Identification of key candidate genes and miRNA-mRNA target pairs in chronic lymphocytic leukemia by integrated bioinformatics analysis. *Molecular Medicine Reports*, 19, 362-374. [\[CrossRef\]](#)
  19. Sbarrato, T., Horvilleur, E., Pöyry, T., Hill, K., Chaplin, L.C., Spriggs, R.V., Stoneley, M., Wilson, L., Jayne, S., Vulliamy, T., Beck, D., Dokal, I., Dyer, M.J.S., Yeomans, A.M., Packham, G., Bushell, M., Wagner, S.D., Willis, A.E. (2016). A ribosome-related signature in peripheral blood CLL B cells is linked to reduced survival following treatment. *Cell Death and Disease*, 7(6), e2249. [\[CrossRef\]](#)
  20. Goudarzi, K.M., Lindström, M.S. (2016) Role of ribosomal protein mutations in tumor development (Review). *International Journal of Oncology*, 48(4), 1313-1324. [\[CrossRef\]](#)
  21. Burger, J.A. (2010). Chemokines and chemokine receptors in chronic lymphocytic leukemia (CLL): From understanding the basics towards therapeutic targeting. *Seminars in Cancer Biology* 20, 424-430. [\[CrossRef\]](#)
  22. Arenas, V., Castaño, J.L., Dominguez-Garcia, J.J., Yañez, L., Pipao'n, C. (2021). A Different View for an Old Disease: NEDDylation and Other Ubiquitin Like Post-Translational Modifications in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Frontiers in Oncology*, 11, 729550. [\[CrossRef\]](#)
  23. Chen, Y., Sun., L. (2022). Inhibition of NEDD8 NEDDylation induced apoptosis in acute myeloid leukemia cells via p53 signaling pathway. *Bioscience Reports* 42(8), 1-16. [\[CrossRef\]](#)
  24. Severin, F., Frezzato, F., Visentin, A., Martini, V., Trimarco, V., Carraro, S., Tibaldi, E., Brunati, A.M., Piazza, F., Semenzato, G., Facco, M., Trentin, L. (2019). In chronic lymphocytic leukemia the JAK2/STAT3 pathway is constitutively activated and its inhibition leads to CLL cell death unaffected by the protective bone marrow microenvironment. *Cancers (Basel)*. 11(12), 1939. [\[CrossRef\]](#)
  25. Zhou, J.D., Yao, D.M., Li, X.X., Zhang, T.J., Zhang, W., Ma, J.C., Guo, H., Deng, Z.Q., Lin, J., Qian, J. (2017). KRAS overexpression independent of RAS mutations confers an adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, 8(39), 66087-66097. [\[CrossRef\]](#)





# ANTİVİRAL İLAÇLARIN HASTANE ENFEKSİYON ETKENİ PSEUDOMONAS AERUGINOSA ÜZERİNDE SİNERJİSTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF THE SYNERGISTIC EFFECT ON THE HOSPITAL INFECTION  
AGENT PSEUDOMONAS AERUGINOSA OF ANTIVIRAL DRUGS

Şükran ÖZTÜRK<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Zonguldak Bulent Ecevit Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,  
67600, Zonguldak, Türkiye

## ÖZ

**Amaç:** Yaygın hastane enfeksiyon ajanı olan *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)'nın tedavisi amacıyla antiviral ilaçlar ile antibiyotiklerin kombinasyon olarak kullanılmalari sonucunda oluşan sinerjistik etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Antiviral ilaçların etken maddesi olarak Umifenovir (UMF) ve Ribavirin (RBV) antibiyotiklerden kolistin ve beta laktamaz inhibitörü sulbaktam ile çalışılmıştır. Çok İlaça Dirençli (ÇİD) ve Kolistin (KOL) dirençli *P. aeruginosa* klinik izolatları çalışmaya dahil edilmiştir. *P. aeruginosa* üzerinde, UMF ve RBV' nin ayrı ayrı Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) mikrodilüsyon yöntemi ile, KOL ve Sulbaktam (SUL) ile sinerjistik etkinliğine ise dama tahtası sinerji testi ile araştırılmıştır.

**Sonuç ve Tartışma:** Dirençli suşlarda, RBV ile KOL ve SUL kombinasyonlarında sinerji ve kısmi sinerji oluşurken (FİK = 0.375-0.75), ATCC 27853 suşu ile yapılan çalışmada indeferans ve aditif (FİK=1.0-2.0) etkileşimin daha yoğun olduğu görülmüştür. UMF ile KOL ve SUL kombinasyonlarında ise sinerji ve kısmi sinerjiler (FİK=0.53-0.75) dikkat çekerken, ATCC 27853 suşlarında aditif (FİK=1.0) etki tespit edilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde UMF ve RBV' nin KOL ve SUL ile kombinasyon kullanımlarının dirençli suşlar üzerinde daha etkin olduğu görülmüş olup, kombinasyonların dirençli hastane enfeksiyon etkenlerinin tedavisinde alternatif bir seçenek olarak kullanılabilirliği fikri gelecek çalışmalarla desteklenmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** Antibiyotik direnci, antiviral ilaç, dama tahtası, *Pseudomonas aeruginosa*, sinerji

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

Gönderilme / Submitted : 28.10.2022

Kabul / Accepted : 12.12.2022

Yayınlanma / Published : 20.01.2023

## ABSTRACT

**Objective:** It was aimed to investigate the synergistic efficacy of antiviral drugs and antibiotics in combination for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), which is a common nosocomial infection agent.

**Material and Method:** Umifenovir (UMF) and Ribavirin (RBV) antibiotics as active ingredients of antiviral drugs, colistin and beta-lactamase inhibitor sulbactam were studied. Multi-Drug Resistant (MDR) and Colistin (COL) resistant *P. aeruginosa* clinical isolates were included in the study. On *Pseudomonas aeruginosa*, the minimal inhibition concentration of UMF, RBV, KOL and SUL separately with the microdilution method, and the synergistic activity of UMF -RBV and KOL-Sulbactam (SUL) were examined with the checkerboard synergy test.

**Result and Discussion:** In resistant strains, synergy and partial synergy occurred in combinations of RBV with COL and SUL (FIC = 0.375-0.75), whereas in the study conducted with ATCC 27853 strain, inferential and additive (FIC = 1.0-2.0) interactions were observed to be more intense. While synergy and partial synergies (FIC=0.53-0.75) were noted in combinations of UMF with KOL and SUL, an additive effect (FIC=1.0) was detected in ATCC 27853 strains. When the results were evaluated, it was seen that the use of UMF and RBV in combination with KOL and SUL was more effective on resistant strains, and the idea that the combinations could be used as an alternative option in the treatment of resistant nosocomial infections should be supported by future studies.

**Keywords:** Antibiotic resistance, antiviral drug, checkerboard, *Pseudomonas aeruginosa*, synergy

## GİRİŞ

*P. aeruginosa*, hastane enfeksiyonlarında sık karşılaşılan ve çoğul antibiyotik direnci göstermesi nedeniyle tedavisi oldukça güç olan bir hastane enfeksiyonu etkeni olarak bilinmektedir [1]. *P. aeruginosa*, ÇİD izolatların ortaya çıkmasını tetikleyerek birden fazla antimikrobiyal madde sınıfına direnç geliştirme yeteneğine sahiptir. Uygunsuz antibiyotik kullanımının, çeşitli antibiyotiklere dirençli izolatların ortaya çıkmasında önemli bir faktör olduğu ve bu durumun dünya genelinde önemli bir sorun oluşturduğu bilinmektedir [2]. Antimikrobiyal direnç gelişiminde uygunsuz antibiyotik kullanımı önemli olmakla birlikte, *Pseudomonas* suşları ampisilin, amoksisilin, amoksisilin-klavunat, 1. ve 2. kuşak sefalosporinler, sefotaksim, seftriakson, nalidiksik asit ve trimetoprim gibi birçok antibiyotik grubuna da intrinsik olarak direnç gösterebilmektedir [3,4]. Buna karşılık, polimiksin tedavisinin artan kullanımı, dünya çapında polimiksine dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının ortaya çıkmasına da neden olmuştur.

*Pseudomonas* enfeksiyonlarının tedavisi, bakterinin birçok antibiyotiğe gösterdiği bu intrinsik direnç nedeniyle oldukça zordur. Ayrıca bu durum ampirik tedavi seçeneklerini de sınırlamaktadır [5]. *Pseudomonas* suşlarının etken olduğu enfeksiyonlarda diğer önemli sorun, antibiyotiklere direncin çabuk gelişmesi ve yüksek oranda olmasıdır [6, 7]. Tüm dünyada bakterinin antibiyotiklere karşı geliştirdiği kazanılmış direnç oranları giderek artmaktadır. Bu nedenle *Pseudomonas*'lar, tedavisi güç ve mortalite oranları yüksek olan ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. Dirençli *Pseudomonas* suşlarında tedavi alternatiflerinden biri kolistindir. Kolistin *Bacillus polymyxa* tarafından sentez edilen polimiksin grubu bir antibiyotiktir. En önemli yan etkisi nefrotoksisite olan kolistin 1950-1980 yılları arasında kullanılmış daha sonra 1980'lerde nefrotoksisite nedeniyle kullanımı çok azalmıştır. Son yıllarda *Acinetobacter baumannii* ve *P. aeruginosa* gibi çoklu ilaç direnci gösteren Gram negatiflerin ortaya çıkması ile yeniden kullanılmaya başlanmıştır. Yakın zamana kadar *Pseudomonas* 'larda kolistin direncinden söz edilmezken, son yıllarda dirençli suşlar bildirilmeye başlamıştır [8,9]. Kolistinin hedefi bakteri hücre membranıdır. Katyonik bir peptid olan kolistin ile Gram negatif bakterilerin dış membranlarındaki anyonik lipopolisakkarid molekülleri elektrostatik ilişkiye girerler ve hücre membranında düzensizliğe yol açarlar. Kolistin, lipopolisakkarid moleküllerini stabil halde tutan magnezyum ve kalsiyumun yerini değiştirerek dış membranda bozulmaya ve oluşan permeabilite bozukluğu ile bakterinin ölümüne neden olmaktadır. Kolistinin antibakteriyel etkisine ek olarak anti-endotoksin aktivitesi de vardır ve lipopolisakkariti nötralize ederek etki göstermektedir [10,11].



Sulbaktam kimyasal olarak bir penisilanik asit sülfondur ve A sınıfı enzimlere karşı özel aktivite gösteren bir  $\beta$ -laktamaz inhibitörüdür. Sulbaktam,  $\beta$ -laktamazların hidrolitik aktivitesini geri dönüşümsüz olarak inhibe edebilen, antibakteriyel aktivite yeteneği az olan veya hiç olmayan, ticari olarak ampisilin veya sefoperazon ile kombinasyon halinde ve  $\beta$ -laktamazı inhibe etmek için genellikle  $\beta$ -laktam antibiyotikler ile birlikte kullanılmaktadır [12]. Sulbaktam, en yaygın  $\beta$ -laktamaz formlarını inhibe edebilir, ancak AmpC sefalosporinaz ile etkileşime giremez. Bu nedenle, genellikle bu geni ifade eden *P. aeruginosa*, *Citrobacter*, *Enterobacter* ve *Serratia* gibi bakterilere karşı çok az koruma sağlar [13].

RBV, özellikle Hepatit C ve belirli influenza virüslerine karşı bir dizi karmaşık tedavinin parçası olarak yaygın kullanılan bir antiviral ilaçtır. RBV' nin antiviral özelliklerinin uzun süredir bilinmesine rağmen, etki mekanizması net olarak araştırılmamıştır, ayrıca birkaç çalışma, antiviral özelliklere ek olarak ribavirinin antibakteriyel özelliklere de sahip olduğunu göstermektedir [14]. UMF [Arbidol olarak da bilinir], S protein/ACE2 etkileşimini hedefleyen ve viral zarfın membran füzyonunu engelleyen benzersiz bir etki mekanizmasına sahip, daha umut verici bir amaca yönelik antiviral ajandır [15]. Arbidol, Hemaglutinin zarf glikoproteinini [HA], hedefleyen mevcut tek antiviral ilaçtır. Arbidol [umifenovir], İnfluenza, Respiratuar Sinsityal Virüs [RSV], Adenovirüs, Cocksackie B5, Parainfluenza, Ebola [EBOV] ve Hepatit B ve C gibi bir dizi zarflı ve zarfsız virüse karşı geniş spektrumlu bir antiviraldir. İnfluenza A ve B virüslerinin çeşitli suşlarına ve alt tiplerine karşı geniş aktivite gösterir [16]. Çalışmamızda, imipenem, meropenem, siprofloksasin vb. dirençli (ÇİD) (Tablo1) ve KOL dirençli *P. aeruginosa* izolatları üzerinde, KOL-RBV- UMF ve SUL-RBV-UMF olmak üzere 2 ayrı grupta sinerjistik etki araştırılmıştır. Literatür araştırmamızda ÇİD ve KOL dirençli olarak tanımlanmış *P. aeruginosa* izolatları üzerinde söz konusu antiviral ilaçlar ile antibiyotiklerin sinerjistik aktivitesini ilişkilendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma, ÇİD ve KOL dirençli *P. aeruginosa* klinik izolatları üzerinde SUL ve KOL antibiyotiklerinin, RBV ve UMF antiviral ilaçlar ile sinerjisini araştırmayı, dirençli suşlar üzerindeki tedavi seçeneklerine alternatif oluşturarak, çok ilaca dirençli klinik izolatlara karşı antibiyotiklerden faydalanabilme seçeneklerini tespit edebilmeyi amaçlamıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Bakteriyel Suşlar ve Antibiyotik Duyarlılığı

Bu çalışmada üç ÇİD ve KOL dirençli *P. aeruginosa* suşu kullanılmış olup, PS1, PS2 ve PS3 olarak adlandırılmıştır. *P. aeruginosa* suşları kültür koleksiyonunda saklanan suşlardan seçilmiştir. ÇİD *P. aeruginosa* klinik izolatlarının ÇİD ve KOL direnci, Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi'nin tavsiyelerine göre belirlenmiştir [17].

### Bakteri İzolasyonu ve Kültüre Edilmesi

Bu izolatlar, kan, idrar, doku, radyolojik görüntü, analiz ve tedavi işlemleri gibi biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji toplama materyalleri ile yapılacak araştırmalar kapsamında kullanılmak üzere hastane kültür koleksiyonundan elde edilmiştir.

Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi [European Centre for Disease Prevention and Control-ECDC] tavsiyeleri doğrultusunda, Genel ÇİD tanımı: "ÇİD:  $\geq 3$  antimikrobiyal kategoride  $\geq 1$  ajana duyarlı olmayan" olarak tanımlanmaktadır. *P. aeruginosa* için ÇİD tanımı; İzolat, listelenen  $\geq 3$  antimikrobiyal kategorisindeki en az 1 ajana duyarlı değildir.

ECDC tarafından yapılan ÇİD tanımı dikkate alınarak çalışmamızda ÇİD olarak tanımlanan ve çalışmaya dahil edilecek PS1 ve PS3 suşları için siprofloksasin, imipenem, levofloksasin, meropenem, seftazidime gibi antibiyotiklere karşı benzer direnç profilleri belirlenmiş izolatlar seçilmiştir (Tablo 1). ÇİD suşlarının antibiyotik direnci, belirlenen antibiyotikler kullanılarak disk difüzyon yöntemiyle doğrulanmıştır [17]. Buna göre siprofloksasin, imipenem, levofloksasin, meropenem, seftazidime dirençli PS1 ve PS3 suşları ÇİD olarak kabul edilmiştir [18, 19]. PS2 ise kolistine dirençli bir suştur ve bu şekilde değerlendirmeye alınmıştır.

### Minimal İnhibisyon Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

ÇİD ve KOL dirençli PS'lere karşı olan minimum inhibisyon konsantrasyonları [17,21] tavsiyesine göre mikro dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla, mikrobiyalarda katyon ayarlı Mueller Hinton Broth [MHB] ile bileşiklerin çift kat dilüsyonları hazırlanmış ve bileşiklerin konsantrasyon aralıkları sırasıyla, RBV, UMF, KOL ve SUL için 128-0.25 µg/mş, 128-0.25 µg/ml, 64-0.125 µg/ml ve 256-0.5 µg/ml olarak ayarlanmıştır. Son aşamada plaklara  $5 \times 10^5$  CFU/ml olacak şekilde bakteri süspansiyonu eklendikten sonra  $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 16-20 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri üremesini engelleyen en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak kabul edilmiştir. Her deney üç kopya halinde gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 1.** *Pseudomonas aeruginosa* klinik izolatları suşların antibiyotik direnç profili

İzolatlar	Direnç profili	Direnç Genleri
<i>P.aeruginosa</i> 1: PS1	Siprofloksasin	
	İmipenem >8	
	Levofloksasin	OXA48, KPC
	Meropenem >8	
	Seftazidim	
<i>P.aeruginosa</i> 2: PS2	Kolistin>4	OXA48, KPC
<i>P.aeruginosa</i> 3: PS3	Beta laktamaz pozitif	
	İmipenem =8	
	Meropenem =8	OXA48, KPC
	Siprofloksasin	
	Levofloksasin	

### RBV ve UMF' nin Antibiyotiklerle Sinerjistik Etkisinin Belirlenmesi

RBV-KOL, UMF-KOL ve RBV-SUL, UMF-SUL arasındaki sinerjiyi [17,21] saptamak için dama tahtası mikro seyreltme yöntemi kullanılmıştır. Bunun için U Tabanlı 96' lık mikrobiyalardan tüm kuyucuklarına 100 µl MHB ve yatay ekseninde seri KOL [64-0.25µg/ml] ve SUL [256-1 µg/ml] antibiyotik dilüsyonları ve dikey ekseninde RBV ve UMF [128-2 µg/ml] antiviral dilüsyonları dağıtılmıştır. Tüm izolatların bakteri süspansiyonları 0.5 McFarland standart bulanıklığına göre hazırlanarak 1:10 oranında seyreltilip, her kuyucuktaki nihai bakteri konsantrasyonunun  $5 \times 10^5$  CFU/ml olmasını sağlamak için 100 µl hacimli her bir kuyucuğa 5 µl olarak inoküle edilmiştir. Mikrobiyalarda 16-20 saat  $35^\circ\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılmıştır.

RBV, UMF ve KOL ile RBV, UMF-SUL arasındaki sinerji ilişkisi, fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu [FIK] ile belirlenerek nicelleştirilmiş ve sinerji,  $\text{FIK} \leq 0,5$  olarak tanımlanmıştır. FIK indeksi [FIKi] aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{FIK indeksi} = \text{FIKA} + \text{FIKB} = \frac{[A]}{\text{MİKA}} + \frac{[B]}{\text{MİKB}}$$

Elde edilen FIKi indeksi şu şekilde yorumlanacaktır: <0.5 sinerji; 0,5-0,75 kısmi sinerji; 0.76-1 katkı etkisi; 1-4 kayıtsızlık; ve >4 antagonizma [20,21].

## SONUÇ VE TARTIŞMA

### İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları

RBV, UMF ve KOL, SUL tedavi ajanlarının dirençli *P. aeruginosa* izolatlarına karşı antimikrobiyal duyarlılık testi MİK ve FİK değerleri Tablo 2 ve Tablo 3' de gösterilmiştir.

Bu çalışmaya, 3 adet ÇİD ve KOL dirençli *P. aeruginosa* klinik suşu dahil edilmiştir. UMF ve RBV antiviral ajanların çeşitli antibiyotiklerle sinerjistik etkisine bakılarak klinikte dirençli suşlara karşı

kullanılması mümkün olabilecek kombinasyonlar bulmak hedeflenmiştir. Bu veriler incelendiğinde RBV ve UMF'nin KOL ve SUL ile yapılan kombinasyon denemelerinde farklı sonuçlara ulaşılmıştır. RBV ile oluşan kombinasyonda dirençli suşlarda çoğunlukla kısmi sinerji görülürken (FİK= 0.5-0.75) *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşunda Aditif (FİK=0.76-1) ve İndeferas (FİK= 1-4) etkinin oluşması dikkat çekmiştir (Tablo 2, Tablo 3). Aynı şekilde UMF ile yapılan antibiyotik kombinasyonlarında ortaya çıkan sinerji tablosu da benzerlik göstermiştir. Konuyla ilgili yapılan bir çalışmaya rastlanmamış olmakla birlikte RBV'nin ve UMF'nin bakteriler üzerinde kullanımıyla ilgili sınırlı sayıda kaynağa ulaşılmıştır.

Kaynaklardan edinilen bilgiler ve yaptığımız çalışma verileri doğrultusunda, antiviral ilaçların antibiyotiklerle kombine bir şekilde uygulanmasının ve tedavi seçeneği olarak kullanılmasının, özellikle dirençli bakteri enfeksiyonları için alternatif bir yöntem olarak kliniğe katkı sağlayabileceği öngörülmektedir.

Penisilin keşfinden bu yana, antibiyotikler bakteriyel enfeksiyonlara karşı birinci basamak tedavi ajanı olarak kullanılmaya devam etmektedir [23,24]. Ancak, antibiyotiklerin yanlış ve yaygın kullanımı, dirençli patojenlerin ortaya çıkmasını büyük ölçüde kolaylaştırmıştır [25,26]. Bu direncin, 2050'de 10 milyondan fazla ölüme sebebiyet verebileceği yönündeki öngörüler durumun ciddiyetini gözler önüne sermektedir [27]. Bu durum, halihazırda kullanımda olan antibiyotiklerin klinikte enfeksiyon etkeni bakterilerin tedavisinde yetersiz hale gelmesini ve dolayısıyla de yeni tedavi seçeneklerinin gerekliliğini ortaya koymaktadır [28].

*P. aeruginosa*, farklı yerlerden izole edilebilen ve klinikte önemli bir enfeksiyon kaynağı olan Gram negatif fırsatçı bir patojen bakteridir [29,30]. Genom yapısı ve hücre iletişim mekanizması [quorum sensing-QS], virülans ve direncin gelişmesinde etkili bir özellik olarak kabul edilmiştir [31, 32].

Güncel çalışmalara bakıldığında, bakterilerin virülansını etkisiz hale getirecek yöntemler ve tedavi seçeneklerinin umut verici olduğu görülmüştür [33]. Bu amaçla kullanıma alınan antiviral ilaçların enfeksiyonu durdurucu bir özelliği gündeme gelmiştir ki bunu, toksin üretimi, sitokinler, bakterilerin yapısında bulunan ve enfeksiyona neden olan bazı işlevleri inhibe etmek suretiyle yapabildiği düşünülmüştür. Hücre sinyalizasyon sistemi gelişmiş bakteri türlerinden biri olan *P. aeruginosa*, antiviral ilaçların uygulanmasında model tür olarak sıklıkla kullanılmaktadır [32].

*P. aeruginosa*, genellikle klinik tedavi başarısızlığına neden olan çeşitli antibiyotik direnç mekanizmalarına sahiptir. Bu nedenle, *P. aeruginosa* enfeksiyonuna karşı yeni alternatif tedavi seçeneklerinin bulunması giderek daha önemli bir hal almaya başlamıştır. Bu bilgilerden yola çıkarak geniş spektrumlu antiviral bir ilaç olan RBV ve UMF' nin *P. aeruginosa* üzerindeki etkinliği ve antibiyotiklerle sinerjistik etki potansiyeli araştırılmıştır.

Yuan vd, 2022' nin yapmış olduğu çalışmada, dimetridazol ve RBV' nin sinerjistik aktivitelerini araştırmış ve ek olarak, bunların polimiksin B, meropenem ve kanamisin ile sinerjistik etkileşimlerini de tanımlayarak antibiyotiklere yüksek dirençli *P. aeruginosa* klinik izolatlarının duyarlılığını arttırdığı sonucuna varmıştır. Araştırmacılar dimetridazole RBV takviyesinin, piyosyanin, hücre dışı proteazlar ve biyofilm dahil olmak üzere *P. aeruginosa* virülans faktörlerinin üretimini de inhibe ettiğini göstermişlerdir. Aynı zamanda ÇİD bakterilerin ortaya çıkmasıyla oluşan halk sağlığı sorununun ele alınmasına da katkıda bulunmaktadır. Mevcut çalışmamızda benzer şekilde, *P. aeruginosa* klinik izolatu üzerinde RBV ile KOL ve SUL'un sinerjistik etkisi araştırılmış ve elde edilen sonuçlar antiviral ilaç olan RBV ile test edilen antibiyotik inhibitör kombinasyonlarının umut vaat edici sinerjistik etkisini göstermiştir (FİK = 0.375-0.75). Aynı yaklaşımlar çerçevesinde çalışmamızda, tek başına kullanıldığında SUL ile RBV' nin birlikte kullanımından doğan sinerjinin dirençli *P. aeruginosa* 'nın oluşturduğu enfeksiyonlarda tedavi edici olarak alternatif oluşturabileceği fikri ortaya çıkmıştır.

**Tablo 2.** PS1, PS2 ve PS3 için KOL, RBV ve UMF MİK ve FIKi değerleri

MİK [ $\mu\text{g/ml}$ ]						
Bakteri	Ajan	Tek	Kombinasyon	FIK	FIKi	Yorum
PS1	KOL	1	0.25	0,25	0.75	Kısmi sinerji
	RBV	128	64	0,5		
PS1	KOL	1	0.5	0,5	1	Aditif
	UMF	64	32	0,5		
PS2	KOL	4	1	0.25	0.75	Kısmi sinerji
	RBV	128	64	0.5		
PS2	KOL	4	0.5	0.125	0.375	Sinerji
	UMF	32	8	0.25		
PS3	KOL	1	0.125	0.125	0.625	Kısmi sinerji
	RBV	128	64	0.5		
PS3	KOL	1	0.125	0.125	0.625	Kısmi sinerji
	UMF	64	32	0,5		
ATCC 27853	KOL	2	2	1	2	İndeferans
	RBV	128	128	1		
	KOL	2	1	0.5	1	Aditif
	UMF	64	32	0.5		

Elde edilen FIK indeksi şu şekilde yorumlanmıştır: <0.5 sinerji; 0,5-0,75 kısmi sinerji; 0.76–1 Aditif [katkı etkisi]; 1-4 indeferans [kayıtsızlık]; ve >4 antagonizma [20,21].

**Tablo 3.** PS1, PS2 ve PS3 için SUL, RBV ve UMF MİK ve FIKi değerleri

MİK [ $\mu\text{g/ml}$ ]						
Bakteri	Ajan	Tek	Kombinasyon	FIK	FIKi	Yorum
PS1	SUL	128	32	0.25	1.25	İndeferans
	RBV	128	128	1		
PS1	SUL	128	32	0,25	0.75	Kısmi sinerji
	UMF	64	32	0,5		
PS2	SUL	256	8	0.0312	0.53	Sinerji
	RBV	128	64	0.5		
PS2	SUL	256	8	0.0312	0.53	Sinerji
	UMF	64	32	0.5		
PS3	SUL	128	32	0.25	1.25	İndeferans
	RBV	128	128	1		
PS3	SUL	128	32	0,25	0.75	Kısmi sinerji
	UMF	64	32	0,5		
ATCC 27853	SUL	64	32	0.5	1.0	Aditif
	RBV	64	32	0.5		
	SUL	64	32	0.5	1.0	Aditif
	UMF	64	32	0.5		

Elde edilen FIK indeksi şu şekilde yorumlanmıştır: <0.5 sinerji; 0,5-0,75 kısmi sinerji; 0.76–1 Aditif [katkı etkisi]; 1-4 indeferans [kayıtsızlık]; ve >4 antagonizma [20,21].

Di Bonaventura vd. (2022)'nin yaptığı çalışmada, genel olarak, bulgular, siklopiroks ve RBV nin *P. aeruginosa* kaynaklı Kistik Fibrozis (KF) hastalarında anti- *P. aeruginosa* ajanları olarak yeniden kullanım için dikkat çekici adaylar olduğunu göstermiştir. Geniş spektrumlu viral üremeyi durdurucu aktiviteye sahip bir guanozin analogu olan RBV' nin antibiyofilm etkisi gösterdiğinin söylenebileceğini belirtmişlerdir [34,35]. Siklopiroks ve RBV' nin anti-inflamatuar ve immünomodülatör etkinliğinin olduğu da gösterilmiştir [36]. Bu etkiler, KF hastalarında, özellikle, enfeksiyonu temizlemede başarısızlık ve alevlenmiş akut inflamatuvar yanıtın pulmoner doku hasarına yol açması k nedeniyle oldukça önemlidir [37,38]. Bu sonuçlar incelendiğinde, siklopiroks ve RBV' kombinasyonunun, geleneksel tıbbi kimya için ilaç geliştirme potansiyeli açısından iyi bir başlangıç noktası olabileceği düşünülmüştür. SUL ve KOL ile RBV' nin kombinasyonu ile ilgili mevcut çalışmamızda özellikle dirençli *P. aeruginosa* suşlarında sinerji ve kısmi sinerji gözlenmiş olup, antibiyotik-antiviral kombinasyon tedavisinin özellikle hastane enfeksiyon etkeni dirençli suşlar üzerinde etkili olduğunu gözlenmiştir. ATTC suşları üzerinde aynı etkiyi oluşturmayan bu kombinasyon seçenekleri, *P. aeruginosa*' ya ait direnç mekanizmalarına müdahale edebilen bir sistemin varlığını akla getirmektedir.

Lenava ve ark. nın (2014) yaptığı çalışmada, kombine anti viral-bakteriyel ilaçların etkinliğinin fare pnömonisi modelinde değerlendirilmesi yapılmıştır. Ostelmavir kullanımı, İnfluenza A virüsü ile enfekte olmuş farelerde nöraminidaz inhibitörü olarak işlev yaparken, *Streptococcus pneumoniae* ile ikincil bakteri kaynaklı enfeksiyon gelişmiş ve bu kombin tedavi seçeneği uygulamasında deneylerde ölüm oranlarının azaldığı gözlenmiştir. Grip enfeksiyonu sonrası gelişen pnömoni semptomlarını ve hastalığın seyrini hafiflettiği görülmüştür [39, 40]. Oseltamivir'in düzenli kullanımının, bir antibiyotik olan ampisilin kullanılmaktan daha etkili bulunduğu bildirilmiştir. UMF' nin antibiyotik ile kombinasyonunda hastalarda komplikasyon gelişmediği gözlenmiştir. Yapılan bazı araştırmalarda arbidol kullanımının çocuk ve yetişkinlerde komplikasyon sayısını azalttığı bildirilmiştir [39]. Tüm bu çalışmalarla bağlantılı olarak, mevcut durumda alınan mifenovirin etkinlik verileri kombine viral-bakteriyel modelde virüs kaynaklı pnömoniyi müteakip bakteriyel enfeksiyon ile İnfluenza sonuçlarına önemli bir katkı sağlamıştır. Ayrıca UMF, bu veriler kapsamında, kullanılabilir daha ileri klinik çalışmaların tasarlanması ve geliştirilmesine konu olan ana etken madde olarak değerlendirilebilir. UMF'yi optimize etmek için tedavi rejiminin ve dozların seçiminin, İnfluenza ve ilişkili ikincil bakteriyel pnömoni olgularını önleme ve tedavi için kullanımının, araştırılmaya devam edilmesi klinik için önemli kazanım olabilir [39].

Veriler incelendiğinde sekonder enfeksiyon olarak gelişen *Pseudomonas* enfeksiyonları için antibiyotikle birlikte verilen UMF' nin bu enfeksiyonların iyileşme sürecinde de katkı sağladığı düşünülmektedir. Çalışmamızda *P. aeruginosa*' ya karşı tek başına ve antibiyotik kombinasyonu ile verilen UMF' nin FİK değerleri incelendiğinde yararlanımının özellikle dirençli suşlara karşı daha yüksek seviyelerde olduğu dikkat çekmiştir. Konuyla ilgili daha detaylı çalışmaların ve in vivo deneylerin yapılması literatüre katkı sağlayabilir.

Sulbaktamın beta-laktam antibiyotiklerle sinerjisi, en belirgin olarak beta laktamazın ana direnç mekanizması olduğu bakteri türlerinde görülmektedir. Bu bileşik ticari olarak ampisilin veya sefoperazon ile kombinasyon halinde mevcuttur. Sulbaktam kombinasyonları, geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz üreten Enterobacteriaceae ve vankomisine dirençli enterokoklar için güçlü seçici tedaviler göstermemiştir. Toplam 3134 aerobik ve fakültatif Gram-negatif basil içeren bir çalışmada, sulbaktam-ampisilin, sırasıyla %56 ve %73 duyarlılık oranlarıyla *E. coli* ve *Klebsiella* spp.'ye karşı test edilen 12 antibiyotik arasında en az aktif ajan olarak bildirilmiştir [40]. Sulbaktam-ampisilin tedavisinden sonra, İdrar yolu ve solunum yolu enfeksiyonlarının persistant, nüks ve süperenfeksiyonlar bildirilmiştir. Kombinasyon psödomonal enfeksiyonlara karşı etkili değildir [12]. Bu nedenle SUL ile yapılan kombin tedavi protokolüne alternatif bir yol sunmak klinik için önemli bir çıkarım olabilir. Çalışma sonuçlarımız incelendiğinde, SUL ile yapılan kombinasyonların FİK değerlerinin tedavide kullanılabilir ölçüde olduğu gözlenmektedir. Özellikle, UMF ve SUL kombinasyonu ile yapılan sinerji çalışmaları sonucunda hastane enfeksiyon etkeni *P. aeruginosa* üzerinde kullanılabilir bir tedavi seçeneği olabileceği ve antimikrobiyal direncin arttığı bu yüzyılda yan etkileri az, ulaşılabilir bu tip kombin tedavilere şans vermek gerektiği ve daha farklı açılardan araştırılmaya değer olduğu düşünülmektedir. Mevcut veriler, başta toksisite testleri olmak üzere *in vivo* çalışmalarla desteklenmelidir.

## TEŞEKKÜR

*P. aeruginosa* klinik izolatlarını paylaşan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sayın Zeynep Ceren KARAHAN' a ve antiviral ilaçları temin etmemde yardımcı olan ve çalışmamı destekleyen Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Sayın Mehmet Altay ÜNAL'a teşekkür ederim.

## YAZAR KATKILARI

Kavram: Ş.Ö.; Tasarım: Ş.Ö.; Denetim: Ş.Ö.; Kaynaklar: Ş.Ö.; Malzemeler: Ş.Ö.; Veri Toplama ve/veya İşleme: Ş.Ö.; Analiz ve/veya Yorumlama: Ş.Ö.; Literatür Taraması: Ş.Ö.; Makalenin Yazılması: Ş.Ö.; Kritik İnceleme: Ş.Ö.; Diğer: Ş.Ö.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## ETİK KURUL ONAYI

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı'ndan 05/10/2022 Tarih ve 2022/17 Sayı'lı Etik Kurul onayı alınmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Mayrand, D., Laforce-Lavoie, A., Larochelle, S., Langlois, A., Genest, H., Roy, M., Moulin, V. J. (2012). Angiogenic properties of myofibroblasts isolated from normal human skin wounds. *Angiogenesis*, 15(2), 199-212. [CrossRef]
2. Gales, A.C., Menezes, L.C., Silbert, S., Sader, H.S. (2003). Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-β-lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(4), 699-702. [CrossRef]
3. Taşbent, F.E., Doğan M., Feyzioğlu, B., Baykan, M. (2013). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas* türlerinin antibiyotiklere direnci. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 43(4), 138-143. [CrossRef]
4. Lee, J.Y., Chung, E.S., Na, I.Y., Kim, H., Shin, D., Ko, K.S. (2014). Development of colistin resistance in *pmrA*-, *phoP*-, *parR*-and *cprR*-inactivated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(11), 2966-2971. [CrossRef]
5. Kollef, M.H. (2006). Is antibiotic cycling the answer to preventing the emergence of bacterial resistance in the intensive care unit? *Clinical infectious diseases*, 43(Supplement\_2), S82-S88. [CrossRef]
6. Henwood, C.J., Livermore, D.M., James, D., Warner, M., *Pseudomonas Study Group*, T. (2001). Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: Results of a UK survey and evaluation of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy disc susceptibility test. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(6), 789-799. [CrossRef]
7. Ak, S., Yıldız, F., Gündüz, A., Köroğlu, M. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıklarının vitek 2 otomatize sistemi ile değerlendirilmesi. *Gazi Medical Journal*, 27(2), 62-64. [CrossRef]
8. Özünel L, Boyacıoğlu Z.İ., Güreşer A.S., Taylan Ö.A.. (2014). Çorum Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde derin trekeal aspirat örneklerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarının antimikrobiyal duyarlılık paternlerinin değerlendirilmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 271, 81-88.
9. Şenol A., Çelik İ. (2021). Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen çok ilaca dirençli *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarına karşı çeşitli antimikrobiyallerin *in vitro* aktiviteleri. *Flora*, 26(1), 96-103. [CrossRef]
10. Evans, M.E., Feola, D.J., Rapp, R.P. (1999). Polymyxin B sulfate and colistin: Old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. *Annals of Pharmacotherapy*, 33(9), 960-967. [CrossRef]
11. Gales, A.C., Reis, A.O., Jones, R.N. (2001). Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: Review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(1), 183-190. [CrossRef]

12. Akova M. (2008). Sulbactam-containing  $\beta$ -lactamase inhibitor combinations. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 185-188. [\[CrossRef\]](#)
13. Nakae T., Saito K., Nakajima, A. (2000). Effect of sulbactam on anti-pseudomonal activity of  $\beta$ -lactam antibiotics in cells producing various levels of the MexAB-OprM efflux pump and  $\beta$ -lactamase. *Microbiology and immunology*, 44(12), 997-1001.
14. Sardushkin, M.V., Shiryaeva, Y.K., Donskaya, L., Vifor, R. (2020). Colloid-Chemical and Antimicrobial Properties of Ribavirin Aqueous Solutions. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(12), 2050-2053.
15. Sanders, J.M., Monogue, M.L., Jodlowski, T.Z., Cutrell, J.B. (2020). Pharmacologic treatments for coronavirus disease 2019 (COVID-19): A review. *Jama*, 323(18), 1824-1836. [\[CrossRef\]](#)
16. Kadam, R.U., Wilson, I.A. (2017). Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(2), 206-214. [\[CrossRef\]](#)
17. ISO [2006] ISO 20776-1 Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices - Part 1: Reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases.
18. Hashemi, A.B., Nakhaei Moghaddam, M., Forghanifard, M.M., Yousefi, E. (2021). Detection of blaOXA-10 and blaOXA-48 Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates by Multiplex PCR. *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases*, 9(3), 142-147.
19. Verma, N., Prahraj, A., Mishra, B., Behera, B., Gupta, K. (2019). Detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* by phenotypic and genotypic methods in a tertiary care hospital of East India. *Journal of Laboratory Physicians*, 11(04), 287-291. [\[CrossRef\]](#)
20. Timurkaynak, F., Can, F., Azap, Ö. K., Demirbilek, M., Arslan, H., Karaman, S.Ö. (2006). *In vitro* activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27(3), 224-228. [\[CrossRef\]](#)
21. Sasidharan, N.K., Sreekala, S.R., Jacob, J., Nambisan, B. (2014). *In vitro* synergistic effect of curcumin in combination with third generation cephalosporins against bacteria associated with infectious diarrhea. *BioMed Research International*, 2014, 561456. [\[CrossRef\]](#)
22. Witzany, C., Bonhoeffer, S., Rolff, J. (2020). Is antimicrobial resistance evolution accelerating? *PLoS pathogens*, 16(10), e1008905. [\[CrossRef\]](#)
23. Czaplewski, L., Bax, R., Clokie, M., Dawson, M., Fairhead, H., Fischetti, V.A., Silverman, J., Hutchings, M.L., Truman, A.W., Wilkinson, B. (2019). Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio Antibiotics: Past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72-80.
24. Dickey, S.W., Cheung, G.Y., Otto, M. (2017). Different drugs for bad bugs: Antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(7), 457-471. [\[CrossRef\]](#)
25. Nadeem, S.F., Gohar, U.F., Tahir, S.F., Mukhtar, H., Pornpukdeewattana, S., Nukthamna, P., Massa, S. (2020). Antimicrobial resistance: More than 70 years of war between humans and bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 46(5), 578-599. [\[CrossRef\]](#)
26. Tagliabue, A., Rappuoli, R. (2018). Changing priorities in vaccinology: Antibiotic resistance moving to the top. *Frontiers in Immunology*, 9, 1068. [\[CrossRef\]](#)
27. Lu, L., Li, M., Yi, G., Liao, L., Cheng, Q., Zhu, J., Zeng, M. (2021). Screening strategies for quorum sensing inhibitors in combating bacterial infection. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 12(1), 1-14. [\[CrossRef\]](#)
28. Kalia, V.C., Purohit, H.J. (2011). Quenching the quorum sensing system: Potential antibacterial drug targets. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(2), 121-140. [\[CrossRef\]](#)
29. Zhao, K., Li, W., Li, J., Ma, T., Wang, K., Yuan, Y., Zhou, X. (2019). TesG is a type I secretion effector of *Pseudomonas aeruginosa* that suppresses the host immune response during chronic infection. *Nature Microbiology*, 4(3), 459-469. [\[CrossRef\]](#)
30. Kumar, L., Brenner, N., Brice, J., Klein-Seetharaman, J., Sarkar, S.K. (2021). Cephalosporins interfere with quorum sensing and improve the ability of *Caenorhabditis elegans* to survive *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Frontiers in Microbiology*, 12, 598498. [\[CrossRef\]](#)
31. Yuan, Y., Yang, X., Zeng, Q., Li, H., Fu, R., Du, L., Zhao, K. (2022). Repurposing Dimetridazole and Ribavirin to disarm *Pseudomonas aeruginosa* virulence by targeting the quorum sensing system. *Frontiers in Microbiology*, 13, 978502. [\[CrossRef\]](#)
32. Fleitas Martínez, O., Cardoso, M.H., Ribeiro, S.M., Franco, O.L. (2019). Recent advances in anti-virulence therapeutic strategies with a focus on dismantling bacterial membrane microdomains, toxin neutralization, quorum-sensing interference and biofilm inhibition. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 74. [\[CrossRef\]](#)







33. Di Bonaventura, G., Lupetti, V., De Fabritiis, S., Piccirilli, A., Porreca, A., Di Nicola, M., Pompilio, A. (2022). Giving drugs a second chance: antibacterial and antibiofilm effects of ciclopirox and ribavirin against cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* strains. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 5029. [\[CrossRef\]](#)
34. She, P., Wang, Y., Luo, Z., Chen, L., Tan, R., Wang, Y., Wu, Y. (2018). Meloxicam inhibits biofilm formation and enhances antimicrobial agents efficacy by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology Open*, 7(1), e00545. [\[CrossRef\]](#)
35. Gupta, A.K., Skinner, A.R. (2003). Ciclopirox for the treatment of superficial fungal infections: A review. *International Journal of Dermatology*, 42(S1), 3-9. [\[CrossRef\]](#)
36. Bergeron, C., Cantin, A.M. (2019). Cystic fibrosis: Pathophysiology of lung disease. In *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* Thieme Medical Publishers, 40(06), 715-726. [\[CrossRef\]](#)
37. Chmiel, J.F., Berger, M., Konstan, M.W. (2002). The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 23(1), 5-27. [\[CrossRef\]](#)
38. Leneva, I.A., Falynskova, I.N., Leonova, E.I., Fedyakina, I.T., Makhmudova, N.R., Osipova, E.A., Zverev, V.V. (2014). Umifenovir (Arbidol) efficacy in experimental mixed viral and bacterial pneumonia of mice. *Антибиотики и химиотерапия*, 59(9-10), 17-24.
39. McCullers, J.A. (2011). Preventing and treating secondary bacterial infections with antiviral agents. *Antiviral Therapy*, 16(2), 123-135. [\[CrossRef\]](#)
40. Noguchi, J.K., Gill, M.A. (1988). Sulbactam: A beta-lactamase inhibitor. *Clinical Pharmacy*, 7(1), 37-51.





## EVALUATION OF ROUNDUP® TOXICITY IN HUMAN LUNG CELLS

### İNSAN AKCİĞER HÜCRELERİNDE ROUNDUP® TOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Burcu ÜNLÜ ENDİRLİK<sup>1\*</sup> , Elçin BAKIR<sup>1</sup> , Aysun ÖKÇESİZ<sup>1</sup> ,  
Zuhal HAMURCU<sup>2,3</sup> , Ayşe EKEN<sup>1</sup> , Aylin GÜRBAY<sup>4</sup> 

<sup>1</sup>Erciyes University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Toxicology, 38280, Kayseri,  
Turkey

<sup>2</sup>Erciyes University, Betül-Ziya Eren Genome and Stem Cell Center, 38280, Kayseri, Turkey

<sup>3</sup>Erciyes University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Erciyes University, 38280,  
Kayseri, Turkey

<sup>4</sup>Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Toxicology, 06230,  
Ankara, Turkey

#### ABSTRACT

**Objective:** *In this study, toxic effects of Roundup, one of the most common glyphosate-based herbicides (GBHs), were assessed on human bronchial epithelial cells (BEAS-2B).*

**Material and Method:** *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide and neutral red uptake assays were implemented for evaluation of cell viability at 24 and 48 h. Apoptosis detection was made by Muse analyzer while Hoechst staining was employed to detect apoptotic nuclear changes. In addition, dichlorofluorescein diacetate assay was used for the assessment of reactive oxygen species (ROS) formation.*

**Result and Discussion:** *Similar half maximal inhibitory concentrations were obtained from cytotoxicity assays. Results showed that significant reduction in the viability of BEAS-2B cells started to occur from 200 µM at 24 h and 50 µM at 48 h treatment times. Roundup treatments were found to cause apoptosis in a dose-dependent manner in both time points and apoptosis increased with increasing exposure time. Moreover, it was observed that cellular ROS formation was induced following Roundup exposure. These findings suggest that GBHs can stimulate ROS production, as well as apoptosis on healthy human lung cells which is important considering inhalation is one of the primary exposure routes to this group of chemicals.*

\* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Burcu Ünlü Endirlik  
**e-mail / e-posta:** burcuunlu@erciyes.edu.tr, **Phone / Tel.:** +903522076666-28327

**Submitted / Gönderilme :** 07.11.2022

**Accepted / Kabul :** 12.12.2022

**Published / Yayınlanma :** 20.01.2023

**Keywords:** Apoptosis, glyphosate, lung cells, reactive oxygen species, toxicity

## ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmada, en yaygın olarak kullanılan glifosat bazlı herbisitlerden (GBH) biri olan Roundup'ın, insan bronşiyal epitel hücrelerine (BEAS-2B) toksik etkileri değerlendirilmiştir.

**Gereç ve Yöntem:** Hücre canlılığının 24 ve 48 saatte değerlendirilmesi amacıyla 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür ve nötral red alım testleri uygulanmıştır. Apoptoz tespiti için Muse analiz cihazı; apoptotik nükleer değişikliklerin değerlendirilmesi için Hoechst boyama tekniği kullanılmıştır. Ayrıca reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumunun değerlendirilmesi için diklorofloresin diasetat yöntemi uygulanmıştır.

**Sonuç ve Tartışma:** Her iki sitotoksikite testinden benzer yarı maksimal inhibisyon konsantrasyonları elde edilmiştir. 24 saatte 200 µM, 48 saatte ise 50 µM maruziyetten sonra BEAS-2B hücrelerinin canlılığında önemli ölçüde azalma olduğu tespit edilmiştir. Her iki zamanda da Roundup maruziyetinin doza bağlı olarak apoptoza neden olduğu ve apoptozun maruz kalma süresinin uzamasıyla arttığı bulunmuştur. Ayrıca, Roundup maruziyeti sonrasında hücreSEL ROT oluşumunun indüklediği gözlenmiştir. Bu bulgular GBH'lerin sağlıklı insan akciğer hücrelerinde ROT üretimini ve apoptozu arttırdığını göstermektedir. GBH'lere başlıca maruziyet yollarından birinin inhalasyon olduğu göz önüne alındığında bu çalışmanın sonuçları önem arz etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Akciğer hücresi, apoptoz, glifosat, reaktif oksijen türleri, toksisite

## INTRODUCTION

Glyphosate-based herbicides (GBHs), one of the most commonly used herbicides, exert their effects by interrupting shikimic acid pathway in plants [1,2]. Non-existence of this pathway in humans and animals was evaluated as a safety factor and resulted in more widespread consumption and environmental accumulation of these substances [3]. Increased usage of plants with glyphosate resistance further contributed to the environmental build-up of these compounds [4,5], which resulted in humans being exposed more to GBH residues [4,6]. In mammals, small amount of the absorbed glyphosate can be metabolized and excreted mostly as a parent compound [7]. Glyphosate (N-(phosphonomethyl) glycine), active component in GBHs, is a broad-spectrum, non-selective, post-emergent pesticide [8, 9]. Roundup is among the most well-known and widely used GBHs in the world [10].

Glyphosate-based herbicides were suggested as more toxic than single glyphosate because of their incorporation of adjuvants [11,12]. Several studies showed glyphosate and GBH exposure were associated with many adverse effects including cardiotoxicity, hepatotoxicity, nephrotoxicity neurotoxicity, immunotoxicity and reproductive toxicity [6-8,10,12,13]. Differences of opinion between authorities on carcinogenic properties of glyphosate led to uncertainties about the safety of this herbicide. International Agency for Research on Cancer (IARC) categorized glyphosate as probable carcinogen (Group 2A) [14] whereas United States Environmental Protection Agency [15] has not reported any relation between glyphosate exposure and human carcinogenicity. More recently, European Chemicals Agency (ECHA) declared current scientific evidence was not sufficient to classify glyphosate as neither carcinogenic, mutagenic or a reprotoxic chemical [16].

Inhalation is one of the primary human exposure routes for GBHs, especially in occupational context [17]. Previous epidemiological studies in farmers reported that glyphosate usage was associated with numerous diseases, including adverse effects on respiratory system. Glyphosate exposure was found to induce oxidative stress and affect lung function in farmers [18]. For this purpose, in the current study, human bronchial epithelial (BEAS-2B) cells were chosen as a model for investigation of Roundup toxicity on lung tissue.

Oxidative stress is among the proposed toxicity mechanisms for GBHs in humans [10]. Oxidative stress is considered to occur when antioxidant defenses in the biological systems were overwhelmed by reactive oxygen species (ROS) production [19]. GBHs might trigger generation of intracellular ROS, as well as cause apoptosis directly or as an indirect consequence of oxidative stress. Apoptosis is a programmed cell death which plays a critical role in regulating cell homeostasis [20]. Considering all these data, in this study, cytotoxicity of Roundup was assessed with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium bromide (MTT), in addition to neutral red (NR) uptake assay for 24- and 48-hour periods in normal human bronchial epithelial cell line. Possible apoptosis-inducing and ROS producing effects of Roundup were also analyzed in this model system.

## MATERIAL AND METHOD

### Chemicals

Roundup Star was supplied from Monsanto (Antwerpen, Belgium). It contains 441 g/l (35.5%) of potassium salt of glyphosate and ethoxylated ether alkylamine (6%). RPMI, penicillin/streptomycin, Trypsin-EDTA and fetal bovine serum (FBS) were supplied by Gibco (Paisley, UK) while other chemicals by Sigma-Aldrich/Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

### Culture of Cells

Human bronchial epithelial (BEAS-2B) cells were bought from American Type Culture Collection. They were cultured in RPMI enriched by FBS, penicillin and streptomycin under 5% CO<sub>2</sub>, 95% humidity and at 37°C.

### Cytotoxicity Tests

Cytotoxicity was assessed with MTT and NR uptake assays. 96 well plates were used for seeding cells with 10<sup>4</sup> cells per well. Cells were exposed to 12.5-800 µM (2.1-135.2 µg/ml) Roundup for 24 and 48 hours. These selected concentrations are well below the agricultural usage level recommendations (2044-8200 µg/ml) [21,22]. MTT assay was performed according to the protocol of Mosmann [23]. For this assay, cells were incubated with 5 mg/ml MTT for 2 hours following Roundup treatment. Then, DMSO was used for dissolving formazan salts. In NR uptake assay, lysosomal integrity was evaluated based on protocol of Borenfreund and Puerner [24]. After Roundup exposure, cells were incubated with NR dye for 3 hours. Then, cells were fixed with formaldehyde (0.5%) in CaCl<sub>2</sub> solution and were exposed to acetic acid (1%) in ethyl alcohol solution. For both assays, absorbance of resulting colors at 540 nm was read using BioTek Synergy plate reader. Wells without cells were used as a blank. Viability of cells was measured using following equation:

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{(\text{Abs. (treatment)} - \text{Abs. (blank)})}{(\text{Abs. (control)} - \text{Abs. (blank)})} \times 100$$

### Determination of Apoptosis

Apoptosis detection was conducted by Muse™ Annexin V and Dead Cell kit based on manufacturer instructions (Merck Millipore, USA). Cells at a density of 3.5×10<sup>5</sup> cells/25 cm<sup>2</sup> flasks were exposed to Roundup for 24 and 48 h. After exposure, cell suspension was obtained. Then, kit reagent was added to this suspension. Following the incubation of this mixture under dark conditions for 20 min, cells were assessed with Muse™ Cell Analyzer (Merck Millipore, USA).

Hoechst staining was employed to detect apoptotic nuclear changes. Cells with a density of 1.5×10<sup>5</sup> per well were seeded into 6-wells plates for Roundup treatment. After rinsing with PBS and fixing with paraformaldehyde (4%), cells were dyed with Hoechst 33258 (5 mg/ml) and washed with PBS. The cell morphology was evaluated under a fluorescence microscope (Eclipse Ti, Nikon). Chromatin condensation and nuclei fragmentation were assessed for apoptosis identification.

### Determination of ROS

Intracellular ROS formation was assessed with dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay based on method by Wang and Joseph [25] with some changes. Cells (2×10<sup>4</sup> cells per well) were treated with Roundup for 24 h on 96 well black plates. Following treatment and washing with HBSS, cells were incubated by 5 µM DCFH-DA. After incubation, cells were rewashed and then fluorescence was observed at 485 nm excitation and 530 nm emission wavelengths with BioTek Synergy plate reader.

Measurement of total protein content was made with Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Wells without probe were used as a blank. Calculation was made according to following equation:

$$ROS\ Induction\ (fold) = \frac{(Fluor.\ (treatment) - Fluor.\ (blank))/Protein\ conc.\ (treatment)}{(Fluor.\ (control) - Fluor.\ (blank))/Protein\ conc.\ (control)}$$

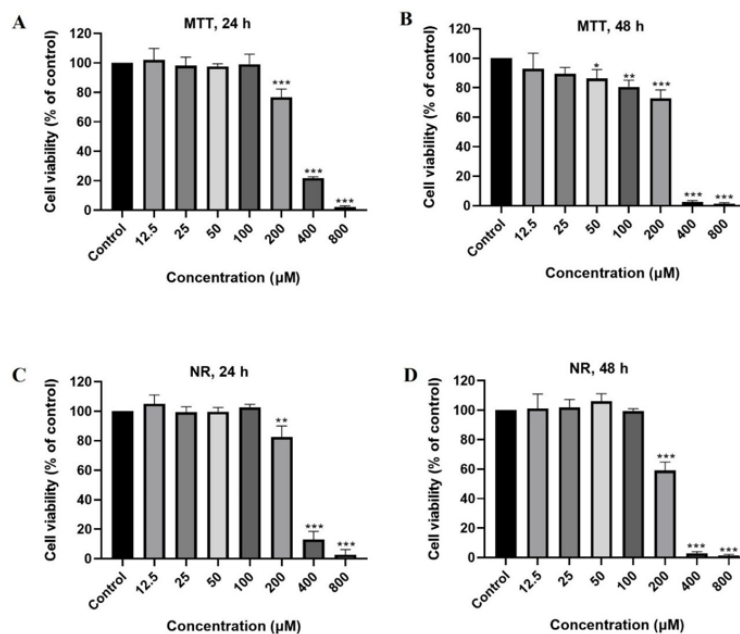
### Statistical Analysis

Statistical analysis was made by one-way ANOVA and Dunnett's Multiple Comparison tests using GraphPad Prism 9. *p* values less than 0.05 were deemed significant. Data were given as mean  $\pm$  standard error (SEM) with  $n \geq 3$ . Half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) values were calculated using GraphPad Prism.

## RESULT AND DISCUSSION

### Induction of Cytotoxicity with Roundup

As shown in Figure 1, following exposure of cells to  $\geq 200\ \mu M$  concentrations of Roundup, cell viability decreased dose-dependently with MTT ( $p < 0.001$ ), and NR assays at 24 h ( $p < 0.01$  at 200  $\mu M$ ;  $p < 0.001$  at 400 and 800  $\mu M$ ) as well as with NR assay at 48 h ( $p < 0.001$ ). Following 48 h incubation, with MTT assay, Roundup caused dose-dependent decreases in cell viability  $\geq 50\ \mu M$  concentrations ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively, at 50 and 100  $\mu M$ ;  $p < 0.001$  for higher concentrations).  $IC_{50}$  values were calculated as 281  $\mu M$  (47.5  $\mu g/ml$ ) and 237  $\mu M$  (40.1  $\mu g/ml$ ) for 24 and 48 h, respectively, for MTT, and 274  $\mu M$  (46.3  $\mu g/ml$ ) and 213  $\mu M$  (36  $\mu g/ml$ ), respectively, for NR uptake assay. Glyphosate-based herbicides had been shown to cause decreases in cell viability on many cell lines including liver, kidney, and nerve cells [11,26,27]. Although there are studies about the

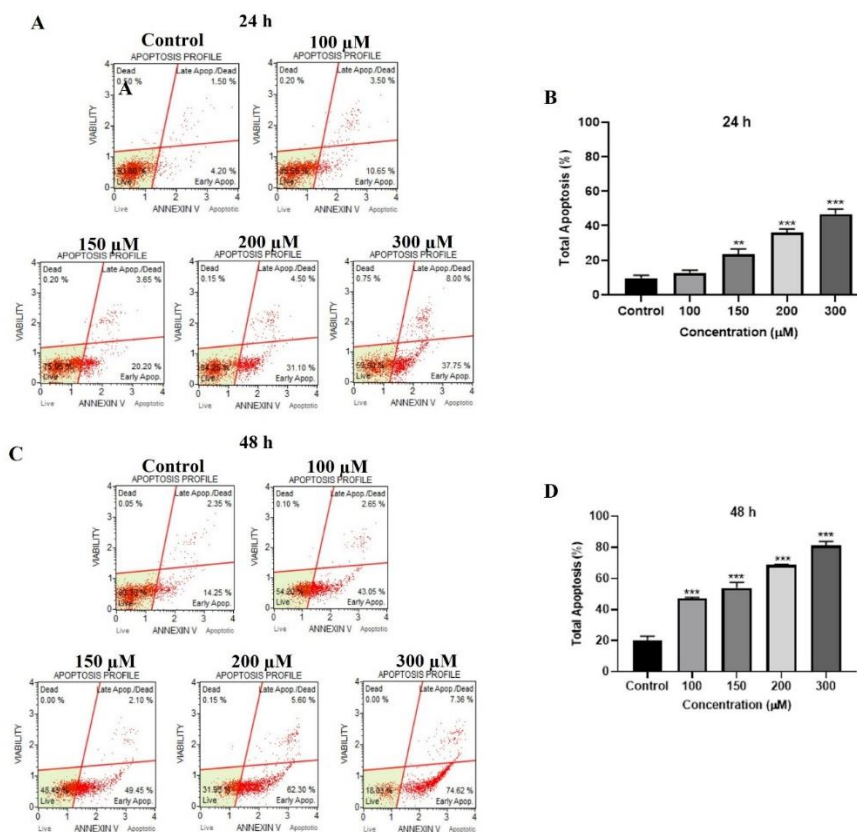


**Figure 1.** Viability of BEAS-2B cells after Roundup exposure. MTT, 24 h (A). MTT, 48 h (B). NR, 24 h (C). NR, 48 h (D). Data given as means  $\pm$  SEM,  $n=3$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. control

cytotoxicity of GBHs on different human lung cell lines, our data showed for the first-time cytotoxic effect of Roundup on healthy lung cells. In agreement with our results, in a study made with human alveolar carcinoma cells (A549) in which toxicity of different glyphosate formulations at 24 h were studied,  $IC_{50}$  values were calculated between 22.9 and 87.7  $\mu\text{g/ml}$  [26]. In another study with the same cell lines, it has been shown that glyphosate significantly reduced cell viability at 1500  $\mu\text{M}$  at 24 h [28]. As mentioned in many other studies, active ingredient glyphosate was considered less toxic than commercial glyphosate formulations with adjuvants [11,12]. Considering the two cytotoxicity test methods, MTT assay primarily detects mitochondrial damage whereas NR assay investigates lysosomal integrity [29]. Lopes et al. found MTT assay exhibited more sensitivity relative to NR assay when zebrafish hepatocytes were exposed to Roundup for 48 h [30]. Goulart et al., on the other hand, reported that lysosomes were more sensitive at low dose of Roundup (67.7  $\mu\text{g/ml}$ ) on the same line of cells [31]. In another study, cytotoxicity profiles of both assays were found similar after HepG2 cells were exposed to GBHs for 48 h which agreed with our observations [32].

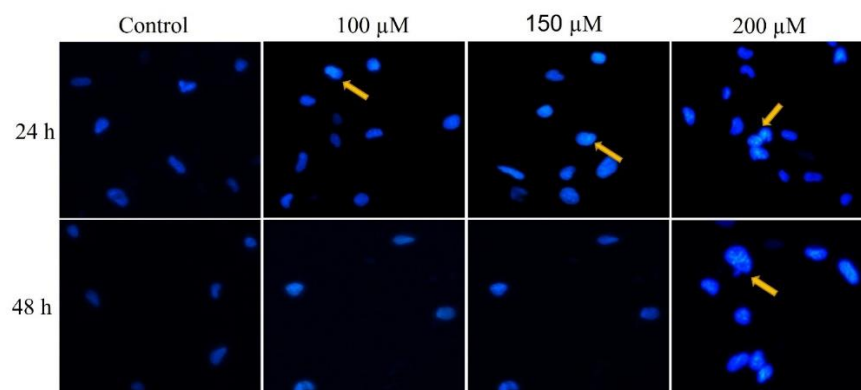
### Roundup Causes Apoptosis in Lung Cells

As seen in Figure 2, 150  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.01$ ) and higher concentrations ( $p < 0.001$ ) caused significant increase in total apoptosis at 24 h, while at 48 h, all doses led to significant cellular apoptosis compared to control ( $p < 0.001$ ). In both time points, apoptotic cell ratio was augmented in dose dependent manner. Nuclear morphological changes including chromatin condensation and fragmentation in the apoptotic cells were also investigated using Hoechst 33258. The slightly colored, homogenous appearance of cells in control group changed to nuclei with bright stain, condensation and fragmentation after treatment with Roundup for 24 and 48 hours, as shown in Figure 3. Results of current study were in line with a



**Figure 2.** Apoptosis of BEAS-2B cells after Roundup exposure. Representative dot plots show the apoptosis profile at 24 h (A) and 48 h (C). Bar graph displays total apoptosis percentage at 24 h (B) and 48 h (D). Data shown in bar graph given as means  $\pm$  SEM,  $n=3$ . \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. control

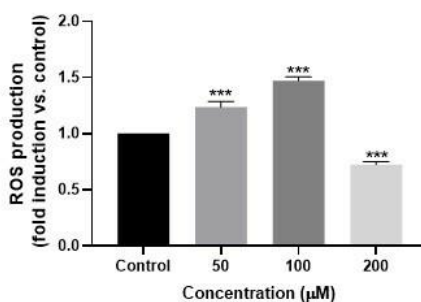
study performed with A549 cells which showed that 50-125  $\mu\text{g/ml}$  concentrations of Roundup led to apoptosis and morphological changes in nuclei [22]. Kwiatkowska et al. also demonstrated that glyphosate caused increases in the percentage of apoptosis and chromatin condensation in human peripheral blood mononuclear cells [33], which is also in agreement with our findings. In another study performed with 3T3-L1 fibroblasts, it has been shown that 1.05 mM GBHs for 24 h increased apoptotic cell rate [34].



**Figure 3.** Assessment of nuclear morphological changes following Roundup exposure. Arrows show nuclear fragmentation ( $\times 20$ )

### Roundup Induces ROS Formation

Reactive oxygen species have an important function in regulating apoptosis pathways [35]. Under normal physiological processes, a certain amount of ROS is produced in the body. Oxidative stress occurs when excessive ROS production overcomes antioxidant defense systems, causing lipid peroxidation, damage to cellular macromolecules and finally, dysfunction and death of cells [10]. In this study, ROS was found to be 1.24 and 1.47-fold ( $p < 0.001$ ) higher compared to control group in 50 and 100  $\mu\text{M}$  exposure groups, respectively, (Figure 4). However, ROS level declined 1.38-fold relative to control after 200  $\mu\text{M}$  treatment ( $p < 0.001$ ). In a previous study, it has been shown that 100  $\mu\text{g/ml}$  Roundup treatment for 2 h increased ROS production in human alveolar carcinoma cells [36]. Bai et al. also found that 60  $\mu\text{g/ml}$  Roundup exposure at 12 h caused ROS formation in porcine intestinal epithelial cells [37]. For comparison, in the current study, Roundup treatment led to increase in ROS levels at a lower dose, 8.45  $\mu\text{g/ml}$ , although our exposure times were also longer relative to above-mentioned studies. In addition, the cell types used might be a factor in obtaining different results. In a study with pure glyphosate, however, ROS level was not changed by 250-750  $\mu\text{M}$  concentrations at 24 h [38]. In our study, decline of ROS at higher dose (200  $\mu\text{M}$ ) might be related to excessive cytotoxicity at high doses.



**Figure 4.** ROS formation after Roundup exposure at 24 h. Data given as means  $\pm$  SEM,  $n=4$ .

\*\*\* $p < 0.001$  vs. control



In conclusion, to the best of our knowledge, this is the first study which investigated toxic effects of a GBH on normal human lung cells. Roundup-induced mitochondrial and lysosomal cytotoxicity on BEAS-2B cells were shown following 24- and 48-hours incubation. In our model system, Roundup also caused cell death through apoptosis and led to ROS formation. Since inhalation is one of the primary exposure routes to this group of chemicals, the results of this study will contribute to the literature, in terms of the evaluation of glyphosate toxicity and its toxicity mechanisms especially in occupationally exposure groups. Furthermore, we believe that the results of current study are important due to the ongoing debate on the safety of GBHs. Although our results point that Roundup may induce ROS and apoptosis in BEAS-2B cells, other oxidative stress related parameters such as lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities, as well as the pathways involved in apoptosis were not measured as a part of this work. We expect that investigations on these subjects will add more information to the toxic effect mechanisms of this group of substances and might set an example for future studies.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by Erciyes University (THD-2018-8670, THD-2018-8671).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: B.Ü.E.; Design: B.Ü.E.; Control: B.Ü.E.; Sources: B.Ü.E., A.E; Materials: B.Ü.E., E.B., A.Ö.; Data Collection and/or Processing: B.Ü.E., E.B., A.Ö., Z.H.; Analysis and/or Interpretation: B.Ü.E., Z.H., A.G.; Literature Review: B.Ü.E.; Manuscript Writing: B.Ü.E., Z.H., A.E., A.G.; Critical Review: B.Ü.E., Z.H., A.E., A.G.; 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. Boocock, M.R., Coggins, J.R. (1983). Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. *FEBS Letters*, 154(1), 127-133. [\[CrossRef\]](#)
2. Duke, S.O., Powles, S.B. (2008). Glyphosate: A once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64(4), 319-325. [\[CrossRef\]](#)
3. Williams, A.L., Watson, R.E. DeSesso, J.M. (2012). Developmental and reproductive outcomes in humans and animals after glyphosate exposure: A critical analysis. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 15(1), 39-96. [\[CrossRef\]](#)
4. Bai, S.H., Ogbourne, S.M. (2016). Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19), 18988-19001. [\[CrossRef\]](#)
5. Chang, F.C., Simcik, M.F., Capel, P.D. (2011). Occurrence and fate of the herbicide glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(3), 548-555. [\[CrossRef\]](#)
6. Soares, D., Silva, L., Duarte, S., Pena, A., Pereira, A. (2021). Glyphosate use, toxicity and occurrence in food. *Foods*, 10(11), 2785. [\[CrossRef\]](#)
7. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Glyphosate. (2020). From <https://wwwn.cdc.gov/> Accessed date: 29 September 2022.
8. Agostini, L.P., Dettogni, R.S., Dos Reis, R.S., Stur, E., Dos Santos, E.V., Vantorim, D.P., Garcia, F.M., Cardoso, R.C., Graceli, J.B., Louro, I.D. (2020). Effects of glyphosate exposure on human health: Insights from epidemiological and in vitro studies. *Science of the Total Environment*, 705, 135808. [\[CrossRef\]](#)
9. Dill, G.M., Sammons, R.D., Feng, P.C., Kohn, F., Kretzmer, K., Mehrsheikh, A., Bleeke, M., Honegger, J.L., Farmer, D., Wright, D., Haupfeard E.A. (2010). Glyphosate: discovery, development, applications, and

- properties. In: V.K. Nandula (Ed.) Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management, (pp. 1-33). John Wiley & Sons, Inc.
10. Wang, X., Lu, Q., Guo, J., Ares, I., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, M.R., Wang, X., Anadón, A., Martínez, M.A. (2022). Oxidative stress and metabolism: A mechanistic insight for glyphosate toxicology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 62, 617-639. [\[CrossRef\]](#)
  11. Mesnage, R., Bernay, B., Seralini, G.E. (2013). Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology*, 313(2-3), 122-128. [\[CrossRef\]](#)
  12. Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendomois, J., Seralini, G.E. (2015). Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology*, 84, 133-153. [\[CrossRef\]](#)
  13. Martins-Gomes, C., Silva, T.L., Andreani, T., Silva, A.M. (2022). Glyphosate vs. glyphosate-based herbicides exposure: A review on their toxicity. *Journal of Xenobiotics*, 12(1), 21-40. [\[CrossRef\]](#)
  14. International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. (2015). From <https://www.iarc.who.int/>. Accessed date: 20 September 2022.
  15. United States Environmental Protection Agency (USEPA). Revised glyphosate issue paper: Evaluation of carcinogenic potential. (2018). From <https://www.regulations.gov/>. Accessed date: 20 September 2022.
  16. European Chemical Agency (ECHA). Glyphosate: No change proposed to hazard classification. (2022). From <https://echa.europa.eu/>. Accessed date: 3 October 2022.
  17. Bradberry, S.M., Proudfoot, A.T., Vale, J.A. (2004). Glyphosate poisoning. *Toxicological Reviews*, 23(3), 159-167. [\[CrossRef\]](#)
  18. Sidthilaw, S., Sapbamrer, R., Pothirat, C., Wunnapuk, K., Khacha-Ananda, S. (2022). Effects of exposure to glyphosate on oxidative stress, inflammation, and lung function in maize farmers, Northern Thailand. *BMC Public Health*, 22(1), 1-10. [\[CrossRef\]](#)
  19. Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291-295. [\[CrossRef\]](#)
  20. Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-776. [\[CrossRef\]](#)
  21. Chaufan, G., Coalova, I., Molina M.D.C.R.D. (2014). Glyphosate commercial formulation causes cytotoxicity, oxidative effects, and apoptosis on human cells: differences with its active ingredient. *International Journal of Toxicology*, 33(1), 29-38. [\[CrossRef\]](#)
  22. Hao, Y., Chen, H., Xu, W., Gao, J., Yang, Y., Zhang, Y., Tao, L. (2019). Roundup confers cytotoxicity through DNA damage and Mitochondria-Associated apoptosis induction. *Environmental Pollution*, 252 (Pt A), 917-923. [\[CrossRef\]](#)
  23. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63. [\[CrossRef\]](#)
  24. Borenfreund, E., Puerner, J.A. (1985). Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, 24(2-3), 119-124. [\[CrossRef\]](#)
  25. Wang, H., Joseph, J.A. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(5-6), 612-616. [\[CrossRef\]](#)
  26. Hao, Y., Zhang, Y., Ni, H., Gao, J., Yang, Y., Xu, W., Tao, L. (2019). Evaluation of the cytotoxic effects of glyphosate herbicides in human liver, lung, and nerve. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 54(9), 737-744. [\[CrossRef\]](#)
  27. Gasnier, C., Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M.C., Seralini, G.E. (2009). Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*, 262(3), 184-191. [\[CrossRef\]](#)
  28. Ergun, H., Cayir, A. (2021). Exposure to glyphosate and tetrachlorvinphos induces cytotoxicity and global DNA methylation in human cells. *Toxicology and Industrial Health*, 37(10), 610-618. [\[CrossRef\]](#)
  29. Fotakis, G., Timbrell, J.A. (2006). *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), 171-177. [\[CrossRef\]](#)
  30. Lopes, F.M., Sandrini, J.Z., Souza, M.M. (2018). Toxicity induced by glyphosate and glyphosate-based herbicides in the zebrafish hepatocyte cell line (ZF-L). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162, 201-207. [\[CrossRef\]](#)
  31. Goulart, T.L., Boyle, R.T., Souza, M.M. (2015). Cytotoxicity of the association of pesticides Roundup Transorb(R) and Furadan 350 SC(R) on the zebrafish cell line, ZF-L. *Toxicology in Vitro*, 29(7), 1377-1384. [\[CrossRef\]](#)
  32. Conte, F.M., Cestonaro, L.V., Piton, Y.V., Guimaraes, N., Garcia, S.C., da Silva, D.D., Arbo, M.D. (2022). Toxicity of pesticides widely applied on soybean cultivation: Synergistic effects of fipronil, glyphosate and imidacloprid in HepG2 cells. *Toxicology in Vitro*, 84, 105446. [\[CrossRef\]](#)



33. Kwiatkowska, M., Michałowicz, J., Jarosiewicz, P., Pingot, D., Sicińska, P., Huras, B., Zakrzewski, J., Jarosiewicz, M., Bukowska, B. (2020). Evaluation of apoptotic potential of glyphosate metabolites and impurities in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Food and Chemical Toxicology*, 135, 110888. [\[CrossRef\]](#)
34. Martini, C.N., Gabrielli, M., Vila Mdel, C. (2012). A commercial formulation of glyphosate inhibits proliferation and differentiation to adipocytes and induces apoptosis in 3T3-L1 fibroblasts. *Toxicology in Vitro*, 26(6), 1007-1013. [\[CrossRef\]](#)
35. Redza-Dutordoir, M., Averill-Bates, D.A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(12), 2977-2992. [\[CrossRef\]](#)
36. Hao, Y., Zhang, Y., Cheng, J., Xu, W., Xu, Z., Gao, J., Tao, L. (2020). Adjuvant contributes Roundup's unexpected effects on A549 cells. *Environmental Research*, 184, 109306. [\[CrossRef\]](#)
37. Bai, G., Zhou, R., Jiang, X., Zou, Y., Shi, B. (2022). Glyphosate-based herbicides induces autophagy in IPEC-J2 cells and the intervention of N-acetylcysteine. *Environmental Toxicology*, 37(8):1878-1890. [\[CrossRef\]](#)
38. Silva, A.M., Martins-Gomes, C., Ferreira, S.S., Souto, E.B., Andreani, T. (2022). Molecular Physicochemical Properties of Selected Pesticides as Predictive Factors for Oxidative Stress and Apoptosis-Dependent Cell Death in Caco-2 and HepG2 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8107. [\[CrossRef\]](#)



## INVESTIGATION OF THE MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION OF USED LIPSTICKS AND MASCARAS

### KULLANILMIŞ RUJ VE MASKARALARDA MİKROBİYOLOJİK KONTAMİNASYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Emine Kübra YAZICI<sup>1</sup> , Müjde ERYILMAZ<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, 06560,  
Ankara, Türkiye

#### ABSTRACT

**Objective:** Carbon and nitrogen sources, minerals, growth factors in the composition of cosmetic products, and environmental conditions such as convenient acidic environment and humidity constitute the suitable environment for microbial growth. Microbiological contamination of these products is important in terms of both posing a risk to consumer health and causing economic losses due to changes occurring in the product. This study aimed to examine the lipstick and mascara samples used by consumers in terms of microbiological contamination.

**Material and Method:** Thirty lipsticks and thirty mascaras used by consumers were investigated for microbiological contamination. The samples were evaluated according to the microbiological limits specified in the European Standard EN ISO 17516. Contaminant bacteria were identified by VITEK® 2 Compact (bioMérieux, France).

**Result and Discussion:** According to the results obtained, it was determined that only one of the tested mascara samples and four of the lipstick samples did not comply with the specified microbiological limit values. *Staphylococcus sciuri* was the contaminant bacterium determined in the mascara sample. In addition, *Kocuria kristinae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus alactolyticus*, *Rothia mucilaginosa*, *Rothia dentocariosa* were detected in lipstick samples. All the bacteria detected as contaminants are Gram-positive, most of which are the members of the mouth, throat, respiratory, and skin microbiota. The contamination may have been caused by the inappropriate use of consumers, such as using the same product by more than one person, contamination of saliva, and not paying attention to hand hygiene.

**Keywords:** Cosmetics, EN ISO 17516, microbial contamination, microbiological quality control, safety testing

\* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Müjde Eryılmaz  
e-mail / e-posta: meryilmaz@ankara.edu.tr, Phone / Tel.: +903122033185

## ÖZ

**Amaç:** Kozmetik ürünlerin içeriğinde yer alan karbon ve azot kaynakları, mineraller, büyüme faktörleri ve asidik ortam, nem gibi uygun ortam koşulları mikrobiyal üreme için elverişli koşulların oluşmasını sağlar. Bu ürünlerin mikrobiyolojik kontaminasyonu hem tüketici sağlığı açısından risk oluşturması hem de üründe meydana gelebilecek değişiklikler nedeniyle ekonomik kayıplara neden olması açısından önem taşımaktadır. Bu çalışmada tüketiciler tarafından kullanılan ruj ve rimel örneklerinin mikrobiyolojik kontaminasyon açısından incelenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada tüketiciler tarafından kullanılan otuz adet ruj ve otuz adet rimel örneği mikrobiyolojik kontaminasyon açısından incelenmiştir. Numuneler, Avrupa Standardı EN ISO 17516'da belirtilen mikrobiyolojik limit değerlerine göre değerlendirilmiştir. Kontaminant bakteriler VITEK® 2 Compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile tanımlanmıştır.

**Sonuç ve Tartışma:** Elde edilen sonuçlara göre, test edilen maskara örneklerinden yalnızca birinin, ruj örneklerinden ise dördünün belirtilen mikrobiyolojik limit değerlerine uygun olmadığı saptanmıştır. Maskara örneğinden izole edilen bakteri *Staphylococcus sciuri*, ruj örneklerinden izole edilen bakteriler ise *Kocuria kristinae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus alactolyticus*, *Rothia mucilaginosus*, *Rothia dentocariosa* türleri olarak tanımlanmıştır. Kontaminasyona neden olan bakterilerin çoğunluğunun ağız, boğaz, solunum ve cilt mikrobiyotasının üyeleri, Gram pozitif türler olduğu görülmüştür. Test edilen kozmetik ürünlerin bulaşının, tüketicilerin uygun olmayan kullanımlarından, aynı ürünü birden fazla kişinin kullanmasından, tükürük bulaşından, el hijyenine dikkat edilmemesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** EN ISO 17516, güvenlik testi, kozmetikler, mikrobiyal kontaminasyon, mikrobiyolojik kalite kontrolü

## INTRODUCTION

Looking good and well-groomed has been important for most people since ancient times. Although the perception of beauty differs according to the conditions of the time and the lifestyles of the societies, people have always cared about being adorned, looking good and well-groomed, and allotted time and budget for this [1]. The first findings on the usage of cosmetics belong to ancient Egyptians. The Ebers Papyrus mentioned that the Egyptians gave importance to their hair and facial appearance and cared about their physical appearance [2,3]. The Council of European Union regulation defines a *cosmetic product* as “any substance or mixture intended to be placed in contact with the external parts of the human body (epidermis, hair system, nails, lips, and external genital organs) or with the teeth and the mucous membranes of the oral cavity with a view exclusively or mainly to cleaning them, perfuming them, changing their appearance, protecting them, keeping them in good condition, or correcting body odors”. Cosmetic products must be delivered to the public effectively, safely, and high-quality manner. These products must be of a nature that will not harm human health when used under conditions that can be foreseen by the manufacturer or in accordance with the presentation, labeling, or the information provided by the manufacturer [4-6].

Carbon and nitrogen sources, minerals, growth factors, and water-based mixtures in the composition of cosmetic products constitute a suitable environment for microbial growth. Microbiological contamination of cosmetic products can originate from raw materials or can occur during manufacturing, packaging steps of the cosmetic product, or during its use by the consumer. Microbiological contamination is important in terms of both posing a risk to consumer health and causing economic losses due to changes in the product. Contaminant microorganisms can metabolize the raw materials in the product with their various hydrolytic enzymes, causing some properties to change and the structure to deteriorate. For example, odor and gas formation, viscosity and colour changes, taste changes, turbidity, precipitation, and membrane formation can be listed as changes in the contaminated product. The skin and mucous membranes act as a physical barrier that prevents the penetration of microorganisms. The damage of these structures and the deterioration of their integrity for various reasons facilitate the entry of microorganisms into the body. Contaminated product use may cause infection in the disintegrated tissue, as well as endotoxin and metabolites produced by microorganisms, which may cause wear, irritation, or allergies in the body [4,6-11].

Microorganisms that frequently cause contamination in cosmetic products are reported as; *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* sp., *Candida albicans* and *Aspergillus* sp. [10,12-14].

Cosmetic products that must be manufactured in accordance with Good Manufacture Practice (GMP) rules are included in the group of non-sterile pharmaceutical products. After the cosmetic product is opened, its microbial safety must be ensured, and its quality and properties must be preserved until the expiration date. Preservatives can be added to cosmetic products at risk of contamination, with a broad spectrum of action, without allergic, toxic, and irritating effects on the consumer, which can protect the product in a way that is equivalent to the expected shelf life plus the usage time [15-17].

European Standard EN ISO 17516 has specified *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *C. albicans* as the microorganisms that should not be present in 1 g/ml of cosmetics. Limits of total aerobic mesophilic microorganisms found in cosmetics are also mentioned. In this standard, the total aerobic mesophilic microorganisms (bacteria-yeast-mould) allowed to be present in lipsticks and mascaras is stated as “ $\leq 1 \times 10^3$  CFU per g or ml” [6,18]. This study aimed to examine the lipstick and mascara samples used by consumers in terms of microbiological contamination.

## MATERIAL AND METHOD

### Sampling

In this study, 30 lipstick and 30 mascara samples belonging to various trademarks and used by consumers were investigated for microbiological contamination. Before opening, the surfaces of the sample containers were disinfected with an aqueous mixture of 70% ethanol (v/v) [19,20]. Then one g of lipstick sample was weighed and dispersed in a nine ml sterile phosphate buffer solution containing 0.1% polysorbate 80 and mixed with a vortex until the sample dissolved. After the applicators of the mascara samples were removed, one ml sterile phosphate buffer solution containing 0.1% polysorbate 80 was added to it. Then the applicator was placed under aseptic conditions and mixed with a vortex. The first dilution was prepared by transferring one ml of sample into a nine ml phosphate buffer solution containing 0.1% polysorbate 80. These suspensions were the  $10^{-1}$  dilutions. In addition,  $10^{-1}$  to  $10^{-3}$  dilutions of samples were prepared for enumerations of aerobic mesophilic bacteria and yeast/mold [19-21].

### Enumeration of Aerobic Mesophilic Microorganism

Enumeration of aerobic mesophilic microorganisms was performed using the pour plate method. First, one ml of each sample was plated in a sterile petri dish in duplicate and pour plated with 20 ml of Tryptone Glucose Extract Agar (TGEA) (Merck, Darmstadt, Germany) for enumeration of the aerobic mesophilic bacteria. Then, the plates were incubated at  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  for 3 to 5 days. After incubation, the number of CFUs per ml or per g of the product was calculated.

### Enumeration of Yeast and Mold

Enumeration of yeast and mold were performed using the pour plate method. First, one ml of each sample was plated in a sterile petri dish in duplicate and pour plated with 20 ml of Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Merck, Darmstadt, Germany) for enumeration of the yeast and mold. Then, the plates were incubated at  $22.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  for 5 to 7 days. After incubation, the number of CFUs per ml or per g of the product was calculated.

### Detection of *Escherichia coli*

One ml of each sample was inoculated onto MacConkey Agar (MCA) (Merck, Darmstadt, Germany) in duplicate. The plates were incubated at  $30-35^\circ\text{C}$  for 18 to 72 h. After incubation, the plates were observed for the growth of brick red colonies with a surrounding zone of precipitated bile on the MCA, indicating the presence of *Escherichia coli* [19,22].

### Detection of *Staphylococcus aureus*

One ml of each sample was inoculated onto Baird Parker Agar (Merck, Darmstadt, Germany) in duplicate. The plates were incubated at 30-35°C for 18 to 72 h. After incubation, the plates were observed for the growth of black, shiny colonies surrounded by clear zones [19,22].

### Detection of *Pseudomonas aeruginosa*

One ml of each sample was inoculated onto Cetrimide Agar (Merck, Darmstadt, Germany) in duplicate. The plates were incubated at 30-35°C for 18 to 72 h. After incubation, the plates were observed for the growth of yellow to green colonies [19,22].

### Detection of *Candida albicans*

One ml of each sample was inoculated onto SDA in duplicate. The plates were incubated at 25°C for 5 to 7 days. After incubation, the plates were observed for the growth of white to beige colonies [19,22].

### Identification of the Microorganisms

Gram staining and microscopic examination were firstly performed. Then, isolated microorganisms were identified at the species level using the VITEK® 2 Compact (bioMérieux, France) [8].

## RESULT AND DISCUSSION

In this study, the number of aerobic mesophilic bacteria was found to be  $3.6 \times 10^3$  CFU/ml in only one of the tested mascara samples. No growth was observed in any of the mascara samples except this one. Considering the lipstick samples, the total number of aerobic mesophilic bacteria in only five samples was calculated as  $2 \times 10^2$  CFU/ml,  $1.1 \times 10^3$  CFU/ml,  $1.2 \times 10^3$  CFU/ml,  $1.5 \times 10^3$  CFU/ml, and  $3 \times 10^3$  CFU/ml, respectively. No growth was observed in the lipstick samples other than these five samples. According to the results, it was determined that only one of the tested mascara samples and four of the lipstick samples did not comply with the specified microbiological limit values stated in European Standard EN ISO 17516. No growth was observed in any lipstick and mascara samples inoculated in SDA medium for enumeration of yeast and mold. The presence of *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* was not detected in any of the tested lipstick and mascara samples. *Staphylococcus sciuri* was the contaminant bacterium determined in the mascara sample. Furthermore, *Kocuria kristinae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus alactolyticus*, *Rothia mucilaginosa*, and *Rothia dentocariosa* were detected in lipstick samples (Table 1).

Organic and inorganic substances in the formulations of cosmetic products create suitable environments for the growth of microorganisms. Today, the tendency toward natural products with organic content rather than inorganic chemical products and the fact that these natural environments with plant and animal content create more favorable environments for the growth of microorganisms draws attention to the importance of contamination [6-8]. Contamination of cosmetic products with microorganisms was first noticed in New Zealand in 1946, with infant deaths caused by talcum powder contaminated with *Clostridium tetani* [23]. In the following years, many studies have shown that cosmetics can be contaminated with different microorganisms from various sources [8,10,13,14,24, 25].

In a study conducted in the United Kingdom, used lip gloss (107), lipstick (96), mascara (93), and eyeliner (92) samples were evaluated for the presence of microbiological contamination. In the lip glosses *Staphylococcus saprophyticus* (2), *Staphylococcus capitis* (2), *Staphylococcus haemolyticus* (1), *Staphylococcus cohnii* (1), *Sporosarcina pasteurii* (1), *Micrococcus luteus* (1), *Bacillus litoralis* (1), *Pseudomonas monteili* (3), *Pseudomonas fulva* (2), *Pseudomonas putida* (1), *Lactobacillus* (1), *Citrobacter freundii* (1), *Candida glabrata* (1); in lipsticks *P. fulva* (2), *P. monteili* (1), *C. freundii* (1); in eyeliners *Cryptococcus diffluens* (1), *Micrococcus luteus* (1), *Burkholderia vietnamiensis* (1), *Bacillus muralis* (1), *Staphylococcus hominis* (2), *S. haemolyticus* (2), *S. saprophyticus* (1), *S. capitis* (2), *E. coli* (2), *Arthrobacter roseus* (1); in mascaras *Pluralibacter gergoviae* (2), *S. saprophyticus* (1) were identified as contaminant microorganisms [8].

**Table 1.** Microbiological Limits Test results of the mascara and lipstick samples and identified microbial contaminants

		Mascara / n* (30)		Lipstick / n* (30)	
Microbiological Limits Test Results	<b>Aerobic Mesophilic Microorganism</b>	n (1)	3.6x10 <sup>3</sup> CFU/ml	n (5)	2x10 <sup>2</sup> CFU/ml 1.1x10 <sup>3</sup> CFU/ml 1.2x10 <sup>3</sup> CFU/ml 1.5x10 <sup>3</sup> CFU/ml 3x10 <sup>3</sup> CFU/ml
	<b>Yeast and Mold</b>	No growth		No growth	
	<i>Escherichia coli</i>	No growth		No growth	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No growth		No growth	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	No growth		No growth	
	<i>Candida albicans</i>	No growth		No growth	
<b>Microorganisms Identified</b>		<i>Staphylococcus sciuri</i>		<i>Kocuria kristinae</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus oralis</i> <i>Streptococcus alactolyticus</i> <i>Rothia mucilaginosus</i> <i>Rothia dentocariosa</i>	

\* n: number of samples

Expiration dates of cosmetic products are determined by the length of time the preservatives formulated in the product are capable of controlling contamination [8]. In a study, three different cosmetic product groups were evaluated regarding microbiological contamination: (i) the expiration date was not passed and was used by only one person, (ii) the expiration date was not passed, and it was used by more than one person, and (iii) it was used after the expiration date. The level of contamination of cosmetic products used by more than one person was found to be higher than those used by only one person. Furthermore, it was observed that the highest contamination was in the products that continued to be used after the expiration date. The contaminant microorganisms were identified as *P. aeruginosa*, *Staphylococcus* sp., *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp. [26].

Studies indicate that cosmetic products are often contaminated during use by the consumer. The most important causes of contamination can be listed as the use of products without considering the expiration date, the use by more than one person, the insertion of fingers or contaminated objects into them, wetting them with saliva, and being in contact with air [8,27]. A study reported that 97.9% of consumers continue to use cosmetic products even if their expiration date has passed. Although the expiration date has passed, mascara is the most used cosmetic product. *S. aureus* (79%) was reported as mascara's most identified contaminant, followed by *P. aeruginosa* (13%) [28]. It was observed that only one of the mascara samples tested in our study did not comply with the microbiological limit values reported by the European Standard EN ISO 17516. Contaminant bacteria isolated from the mascara sample was identified as *Staphylococcus sciuri*. *S. sciuri*, coagulase-negative staphylococci, is mainly found in animals but also common in soil, water, and plants. Although the incidence is rare, *S. sciuri* has been associated with severe infections in humans, such as peritonitis, endocarditis, wound infections, and septic shock [29]. It is thought that the contamination in the tested mascara sample may originate from pets or the environment due to the user does not pay attention to the hygiene rules.

In a study, it was reported that corneal ulcers caused by *P. aeruginosa* develop via scratches on the cornea due to the use of mascara [30]. In another study, Reid and Wood indicated that a corneal ulcer developed in a 47-year-old woman due to using mascara contaminated with *P. aeruginosa* [31].

Cosmetic products with high water content are more suitable for microbial growth in case of contamination [7,9,10]. Dadashi and Dehghanzadeh reported that the contaminated mascaras have more bacterial diversity due to their aqueous-based formulation [32].

Lipsticks contain oils, wax, antioxidants, and emollients. Oily environments are less conducive to microbial growth than aqueous media. Therefore, lipstick's composition does not support microbial growth [33]. Jung et al. indicated that the contaminant bacteria in lipsticks are generally Gram-positive, facultative anaerobe opportunistic pathogens, and they identified the contaminant bacteria as *S. aureus*, *S. salivarius*, and *S. epidermidis*. Most microorganisms in the microbiota are opportunistic pathogens, which are essential because they can cause significant infections, particularly in immunocompromised individuals. Sharing cosmetics with different people may pose a health risk since each person's microbiota is unique and could harm others [8,32,34]. In our study, we isolated the *Kocuria kristinae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus alactolyticus*, *Rothia mucilaginosa*, and *Rothia dentocariosa* from lipstick samples. All these bacteria were Gram-positive and members of the mouth, throat, respiratory, and skin microbiota. Therefore, it is thought that the contamination may have been caused by the inappropriate use of consumers, such as the use of the same product by more than one person, contamination of saliva, and not paying attention to hand hygiene.

Our findings showed that the contaminant bacteria are Gram-positive, most of which are the mouth, throat, respiratory, and skin flora members. Therefore, it is thought that the contamination may have been caused by the inappropriate use of consumers, such as the use of the same product by more than one person, contamination of saliva, and not paying attention to hand hygiene. In order to prevent microbial contamination, cosmetic products should be used by paying attention to hygiene rules, not sharing with others, storing them under appropriate conditions, and paying attention to the labels, which usually express the product's life after opening.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research is based on the data obtained from the MSc. dissertation of Emine Kübra Yazıcı entitled "Investigation of the Potential Microbial Contaminations in Some Used Cosmetic Products" submitted to Ankara University Graduate School of Health Sciences.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

## 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. Yavaşal Çarıkçı, A.İ., Uçar, F., Yalçın, H.T. (2008). Kozmetik ürünlerde bakteriyel ve fungal kompozisyonun klasik yöntemler ve PCR yöntemi kullanılarak saptanması. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, 6(1),1-16.
2. Çomoğlu, T. (2012). Kozmetikler. Marmara Pharmaceutical Journal. 16, 1-8. [CrossRef]
3. Azak Sungur, S., Sözen Şahane, B., Yeğenoğlu, S. (2018). Kozmetik ürünlerin tarihçesi, ürün tanımlarının tüketici davranışı ve yasal durum açısından değerlendirilmesi. Lokman Hekim Dergisi, 8, 191-197. [CrossRef]
4. The European Parliament and the Council of the European Union Regulation (EC) No. 1223/2009 of the European parliament and of the council of 30 November 2009 on cosmetic products. Official Journal of the European Union, 2009, 342, 59.
5. Kozmetik Kanunu, Resmi Gazete Tarihi: 30.03.2005, Sayı: 25771, Kanun Numarası: 5324.

6. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Kozmetik Ürünlerde Güvenlilik Değerlendirmesine İlişkin Kılavuz Sürüm 3.0 (2020). From [https://titck.gov.tr/storage/Archive/2020/contentFile/asd\\_977f480b-4a07-4e0e-bb0e-14db1fcf47d6.pdf](https://titck.gov.tr/storage/Archive/2020/contentFile/asd_977f480b-4a07-4e0e-bb0e-14db1fcf47d6.pdf). Accessed date: 02.11.2021.
7. Birteksöz-Tan, A.S., Tüysüz, M., Ötük, G. (2013). Investigation of preservative efficacy and microbiological content of some cosmetics found on the market. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26, 153-157.
8. Bashir, A., Lambert, P. (2019). Microbiological study of used cosmetic products: Highlighting possible impact on consumer health. *Journal of Applied Microbiology*, 128(2), 598-605. [CrossRef]
9. Lundov, M., Moesby, L., Zachariae, C. and Johansen, J. (2009). Contamination versus preservation of cosmetics: A review on legislation, usage, infections, and contact allergy. *Contact Dermatitis*, 60, 70-78. [CrossRef]
10. Eldesoukey, R.M.M., Alqhtani, B.S., Alqhtani, A.S., Alqhtani, A.H., Alqhtani, A.M. (2016). Comparative microbiological study between traditional and modern cosmetics in Saudi Arabia. *Enzyme Engineering*, 5, 2. [CrossRef]
11. Neza, E., Centini, M. (2016). Microbiologically contaminated and over-preserved cosmetic products according rapex 2008-2014. *Cosmetics*, 3, 3. [CrossRef]
12. Scientific Committee on Consumer Products (2016). The SCCP's Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and Their Safety Evaluation. From [https://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/consumer\\_safety/docs/sccs\\_o\\_190.pdf](https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_190.pdf). Accessed date: 02.11.2021.
13. Babalola, M., Eze, M. (2018). Microbiological quality and characterization of potential pathogens associated with selected brands of commercial cosmetic products in Nigeria. *Microbiology Research Journal International*, 9, 1-17. [CrossRef]
14. Michalek, I.M., John, S.M., Caetano dos Santos, F.L. (2019). Microbiological contamination of cosmetic products-observations from Europe, 2005-2018. *Journal of European Academy of Dermatology and Venereology*, 33, 2151-2157. [CrossRef]
15. FDA (2020a) Microbiological safety and cosmetics. From <https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetic-products-ingredients/cosmetic-products>. Accessed date: 22.11.2022
16. FDA (2020b) ASEAN Guidelines for Cosmetic Good Manufacturing Practice. From <https://www.fda.moph.go.th/sites/Cosmetic/Lists/ASEANCH/Attachments/58/Appendix%206%20ASEAN%20Cosmetic%20GMP.pdf>. Accessed date: 22.11.2022
17. Halla, N., Fernandes, I.P., Heleno, S.A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Rodrigues, A.E., Ferreira, I., Barreiro, M.F. (2018). Cosmetics preservation: A review on present strategies. *Molecules*, 23(7), 1571. [CrossRef]
18. EN ISO 17516 (2014) Cosmetics–Microbiology–Microbiological limits. Beuth, Berlin. From <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:17516:ed-1:v1:en> (consulted February 2016). Accessed date: 22.11.2022
19. The Food and Drug Administration (FDA) of the United States (2017). Bacteriological Analytical Manual Microbiological Methods for Cosmetics. Chapter 23. From <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-23-methods-cosmetics>. Accessed date: 22.11.2022.
20. Kaynak Onurdağ, F., Özgen, S., Abbasoğlu, D. (2010). Microbiological investigation of used cosmetic samples. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 30(1), 1-16.
21. European Pharmacopoeia 9.0, 2.6.12. Microbiological examination of non-sterile products: Microbial enumeration tests, 2017.
22. European Pharmacopoeia 9.0, 2.6.13. Microbiological examination of non-sterile products: Microbial enumeration tests, 2017.
23. Hills, S. (1946). The isolation of *Cl. tetani* from infected talc. *New Zeland Medical Journal*. 45, 419-423.
24. Jairoun, A.A., Al-Hemyari, S.S., Shahwan, M., Zyoud, S.H. (2020). An investigation into incidences of microbial contamination in cosmeceuticals in the UAE: Imbalances between preservation and microbial contamination. *Cosmetics*. 7, 92. [CrossRef]
25. Baird, R.M. (1998). Contamination of non-steril pharmaceuticals in hospital and community environments. In: W.B. Hugo and A.D. Russell (Eds). *Pharmaceutical Microbiology*, (pp. 374-384). Blackwell Science, Oxford.
26. Skowron, K., Jakubicz, A., Budzyńska, A., Kaczmarek, A., Grudlewska, K., Reśliński, A., Gospodarek-Komkowska, E. (2017). Microbiological purity assessment of cosmetics used by one and several persons and cosmetics after their expiry date, national institute of public health-national institute of hygiene. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 68(2), 191-197.
27. Geis, P.A. (2006). Preservation strategies in: *Cosmetic Microbiology*, 2nd ed. In: P.A. Geis (Eds). (pp.163-180). New York: Taylor&Francis Group.



28. Giacomel, C., Dartora, G., Dienfethaeler, H. and Haas, S. (2013). Investigation on the use of expired make-up and microbiological contamination of mascaras. *International Journal of Cosmetic Science*, 35, 375-380. [\[CrossRef\]](#)
29. Kengkoom, K., Ampawong, S. (2017). Staphylococcus sciuri associated to subcutaneous abscess and dermatitis in ICR Mouse. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 69, 117-122. [\[CrossRef\]](#)
30. Wilson, S.E., Bannan, R.A., McDonald, M.B., Kaufman, H.E. (1990). Corneal trauma and infection caused by manipulation of the eyelashes after application of mascara. *Cornea*, 9, 181-182.
31. Reid, F.R., Wood, T.O. (1979). Pseudomonas corneal ulcer. The causative role of contaminated eye cosmetics. *Archives of Ophthalmology*, 97(9), 1640-1641. [\[CrossRef\]](#)
32. Dadashi, L., Dehghanzadeh, R. (2016). Investigating incidence of bacterial and fungal contamination in shared cosmetic kits available in the women beauty salons. *Health Promotion Perspectives*, 6, 159-163. [\[CrossRef\]](#)
33. Vassoler, M., Tonial, F., Fagundes, S.C., Fagundes, M.A., Zortea, N.B., Rossato-Grando, L.G., Bertol, C.D. (2020). Microbiological contamination of in-store lipstick testers available to the consumer. *Mundo da Saúde*, 44, 261-268. [\[CrossRef\]](#)
34. Jung, I.H., Kim, J.H., Yoo, Y.J., Park, B.Y., Choi, E.S., Noh, H. (2019). A pilot study of occupational exposure to pathogenic microorganisms through lip cosmetics among dental hygienists. *Journal of Occupational Health*, 61, 297-304. [\[CrossRef\]](#)



## NASAL CARRIAGE OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN PHARMACIST AND PHARMACY PERSONNEL

### ECZACI VE ECZANE PERSONELİNDE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* BURUN TAŞIYICILIĞI

Halil BAL<sup>1\*</sup> , Sulhiye YILDIZ<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology,  
58100 Sivas, Turkey

<sup>2</sup>Lokman Hekim University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology,  
06510 Ankara, Turkey

#### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to determine the *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) nasal carriage rates and risk factors in pharmacist and pharmacy personnel.

**Material and Method:** 300 nasal swabs were collected from volunteers (pharmacist and pharmacy personnel) working in pharmacies in Ankara, Turkey. Samples were identified as *S. aureus* by phenotypic methods. Methicillin resistance of the strains was determined in accordance with the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) by the disk diffusion method and the presence of the *mecA* gene was investigated by Polymerase Chain Reaction (PCR). Volunteers were asked to answer some questions (age, sex etc.) and risk factors for nasal *S. aureus* carriage were investigated.

**Result and Discussion:** *S. aureus* was detected in 64 (21.3%) of 300 samples and of which 4 (1.3%) were identified as Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA). *S. aureus* carriage rates were found to be 25.7% in pharmacist and 20% in pharmacy personnel. There was no significant difference between these two groups ( $p>0.05$ ). A significant difference was found between some risk factors (smoking, diabetes, and outpatient treatment in hospital within the past year) and nasal *S. aureus* carriage ( $p<0.05$ ). We think that compliance with hand hygiene and effective infection control policies can reduce the rates of *S. aureus* and MRSA carriage.

**Keywords:** *mecA*, methicillin resistance *Staphylococcus aureus*, polymerase chain reaction, *Staphylococcus aureus*

\* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Halil Bal  
e-mail / e-posta: halilbal@cumhuriyet.edu.tr, Phone / Tel.: +905079479600

Submitted / Gönderilme : 01.12.2022

Accepted / Kabul : 28.12.2022

Published / Yayınlanma : 20.01.2023

## ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı eczacı ve eczane personelindeki *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) burun taşıyıcılık oranlarının ve risk faktörlerinin belirlenmesidir.

**Gereç ve Yöntem:** Ankara'daki eczanelerde çalışan eczacı ve eczane personelinde oluşan gönüllü bireylerden 300 nazal sürüntü örneği toplandı. Örnekler fenotipik yöntemler ile *S. aureus* olarak tanımlandı. Suşların metisilin direnci CLSI önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile belirlendi ve *mecA* geninin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile araştırıldı. Gönüllülerden bazı sorulara (yaş, cinsiyet vb.) cevap vermesi istenerek nazal *S. aureus* taşıyıcılığı için risk faktörleri araştırıldı.

**Sonuç ve Tartışma:** 300 örneğin 64'ü (21.3%) *S. aureus* ve 4'ü (1.3%) metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) olarak tespit edildi. Nazal *S. aureus* taşıyıcılık oranları eczacılarda % 25.7, eczane personelinde % 20 olarak belirlendi. Bu iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0.05$ ). Bazı risk faktörleri (sigara içmek, şeker hastası olmak ve son bir yıl içerisinde hastanede ayakta tedavi görmek) ile nazal *S. aureus* taşıyıcılığı arasında anlamlı bir fark bulundu ( $p<0.05$ ). El hijyenine ve enfeksiyon kontrol politikalarına uyumun *S. aureus* ve MRSA taşıyıcılık oranlarını azaltabileceğini düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** *mecA*, metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, polimeraz zincir reaksiyonu, *Staphylococcus aureus*

## INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is a bacterium that causes community and hospital-acquired infections [1]. Although *S. aureus* is colonized in various parts of the body, its main ecological niche is the anterior nares [2]. *S. aureus* is permanently colonized in the anterior nares of approximately 30% of people [3]. Endogenous nasal colonization is a common source of infection and a strong risk factor for subsequent colonization [4,5]. *S. aureus* nasal carriage rates are higher in health care workers (HCWs) than in the community [6]. HCWs who interact with hospital and community can cause cross contamination of hospital-acquired and community-acquired MRSA [7]. It is difficult to treat infections caused by MRSA [8]. MRSA carriers can cause major problems for critically ill patients in the hospital [9]. The hands of HCWs can cause the transmission of an infectious microorganism to the patient [10]. It is recommended that healthcare workers be screened for MRSA in order to reduce the spread of MRSA in the hospital [11]. It is important to know the rates of *S. aureus* and MRSA carriage in healthcare workers for appropriate antibiotic treatment [12]. Hand hygiene and environmental decontamination are measures that can be taken to control and prevent the spread of MRSA [13].

The aim of this study was to determine the rates of *S. aureus* nasal carriage and risk factors in pharmacist and pharmacy personnel who were in contact with patients and their relatives.

## MATERIAL AND METHOD

Our study was carried out between June and September 2014 with 300 volunteers consisting of pharmacist and pharmacy personnel working in pharmacies in Ankara, Turkey.

### Isolation and Identification of Bacteria

Swab samples from both nostrils of the volunteers were transferred to stuart transport medium (Oxoid, England). The samples were passaged on 5% sheep blood agar medium (Blood Agar Base Merck, Germany) and incubated at 37°C for 24 hours. After incubation, isolates were confirmed as *S. aureus* by conventional methods [14].

### Antibiotic Susceptibility Testing

The phenotypic determination of methicillin resistance of strains was carried out by disk diffusion method using oxacillin (1µg, Oxoid, Basingstoke, UK) and cefoxitin disks (30 µg, Oxoid, Basingstoke, UK). The results were evaluated according to Clinical and Laboratory Standards Institute recommendations [15].

## DNA Isolation and *mecA* Gene Amplification

The presence of the *mecA* gene was investigated to determine the methicillin resistance of the strains by molecular method. DNA isolation was performed from *S. aureus* strains in accordance with the recommendations of Okamoto et al. [16]. After DNA isolation, the samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until they were studied. For the amplification of the *mecA* gene, the primers *mecA*-1-F (5 GTAGAAATGACTGAACGTCGATAA-3), *mecA*-2-R (5 CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA-3) were used. As a result of PCR performed with these primers, amplicons with a size of 310 bases were produced [17]. PCR buffer (added  $\text{MgCl}_2$ ), dNTPs, Taq DNA polymerase (GeneDirex Inc., USA), primers (Iontek, Turkey), ddH<sub>2</sub>O, template DNA were used in the PCR reaction. (Table 1). PCR reactions were performed in a thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700 PE Applied Biosystems, Norwalk, CT, USA). (Table 2). The amplicons were evaluated in 2% agarose gel electrophoresis (RunVIEW, Cleaver Scientific, UK) containing 0.5 ug/ml ethidium bromide (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Germany) and photographed on the imaging device (Vilbert Lourmat Photodocumentation and Imaging Systems, France). Amplicons were size confirmed with a DNA Ladder (Thermo Scientific™ O'RangeRuler™ 50 bp DNA Ladder, Lithuania).

**Table 1.** PCR Reaction Mix

Components	Volume	Stock Concentration	Final Concentration
PCR Buffer (added $\text{MgCl}_2$ )	5 $\mu\text{l}$	10X	1X
Taq Polymerase	0.25 $\mu\text{l}$	5 U/ $\mu\text{l}$	1.25 U
Forward Primer	2 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{M}$
Reverse Primer	2 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{M}$
dNTPs	0.4 $\mu\text{l}$	25mM	0.2 mM
ddH <sub>2</sub> O	35.35 $\mu\text{l}$		
Template DNA	5 $\mu\text{l}$		
Final Volume	50 $\mu\text{l}$		

**Table 2.** PCR Protocol

Step	Cycles	Temperature	Time
Initial denaturation	1	94°C	5 min.
Denaturation	40	94°C	30 s.
Annealing	40	55°C	30 s.
Extension	40	72°C	1 min.
Final Extension	1	72°C	1 min.

## Statistical Analysis

The data were analyzed in SPSS 20.0 (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Results were compared using the Independent Sample t test.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULT AND DISCUSSION

In this study, 70 (23.3%) of the volunteers were pharmacists, 41 (13.7%) of the pharmacists were males and 29 (9.7%) of them were females. Of the 230 (76.7%) pharmacy personnel, 162 (54%) were males and 68 (22.7%) were females. Volunteers were asked to answer some questions (age, sex, outpatient treatment in hospital within the past year, using antibiotics in the last month, smoking, diabetes). *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300 were used as control strains in this study.

*S. aureus* was detected in 64 (21.3%) of 300 nasal swabs were collected from pharmacist and pharmacy personnel. MRSA was found in 4 (1.3%) of the strains, of which 3 (1%) were resistant to ceftazidime and 1 (0.3%) was resistant to both oxacillin and ceftazidime. The presence of *mecA* gene of

MRSA strains was investigated by PCR and it was determined that all of them produce amplicons with a size of 310 bases. Thus, methicillin resistance was genotypically confirmed in the strains.

18 (25.7%) *S. aureus* strains were isolated from pharmacists, of which 11 (15.7%) were males and 7 (10%) were females. 46 (20%) *S. aureus* strains were isolated from pharmacy personnel, of which 33 (14.3%) were males and 13 (5.7%) were females. *S. aureus* carriage rates were found to be 25.7% in pharmacists and 20% in pharmacy personnel. There was no significant difference between these two groups ( $p>0.05$ ) (Table 3). Nasal carriage rates of *S. aureus* have been reported to range from 22.7% to 48% among different countries and categories of healthcare professionals [18-20]. The *S. aureus* carriage findings in our study were similar to the findings in other studies conducted in Turkey 20% [21], Egypt 22.9% [22], China %21.6, [23] and Spain %24.3, [24]. In some countries such as Germany 33.8% [25], France 38.8% [1], America 43.8% [26] the rates of *S. aureus* carriage in studies were higher than our findings.

In this study, MRSA was detected in 4 (1.3%) volunteers and 3 (1%) of them were isolated from males pharmacy personnel and 1 (0.3%) from female pharmacy personnel. MRSA carriage ranges from 0.37 % to 13 % in some studies [11,12,21,27]. The MRSA rates in our study were similar to the studies in China 1% [23] and Spain 1.3% [24].

The difference in *S. aureus* and MRSA carriage rates depend on many factors such as culture techniques, sample size, inadequate hand hygiene, limited infrastructure, lack of personnel protective equipment, insufficient information about transmission routes [28]. In our study, which examined some risk factors for *S. aureus* carriage, the difference between the smoker and non-smoker group was found to be significant ( $p<0.05$ ). Smoking decreases IgA production, increases mucus production, impairs epithelial elastic properties and affects phagocyte activities. As a result, bacterial colonization is facilitated, the inflammatory response is exacerbated, host immunity is further impaired, bacterial colonization is promoted in the respiratory tract [29]. Our study was consistent with studies in which smoking was found to be a risk factor of *S. aureus* carriage [21,29,30]. In many studies, it has been reported that diabetes increases the colonization of *S. aureus* [32-36]. Anafo et al [31] found that there was a significantly associated between *S. aureus* carriage and diabetes. Our study was in line with this study ( $p<0.05$ ) (Table 3). In this study, there was no significant association between nasal *S. aureus* carriage and other risk factors (age, gender, antibiotic use in the last month ( $p>0.05$ ) (Table 3). However, a significant difference was observed between the volunteers who received outpatient treatment at the hospital in the last year and the *S. aureus* carriage ( $p<0.05$ ) (Table 3).

Pharmacist and pharmacy personnel are healthcare workers who are in contact with the patients. Therefore, we think that our results were similar to hospital-acquired nasal *S. aureus* and MRSA carriage rates. HCWs are the source of transmission of *S. aureus* and MRSA in the hospital and environmental setting. Compliance with hand hygiene is the most effective way to prevent and control the transmission of *S. aureus* and MRSA. Additionally, we predict that *S. aureus* and MRSA carriage rates can be reduced with rapid detection and treatment of *S. aureus* and MRSA carriers, Judicious Use of Antibiotics and effective infection control policies.

**Table 3.** *S. aureus* carriage rates and risk factors

<i>S.aureus</i> Culture Results			
Age	Total	Positive	Negative
18-30	156 (52)	33 (21)	123 (79)
31-40	107 (35.7)	26 (24)	81 (76)
41-57	37 (12.3)	5 (13.5)	32 (86.5)
	N:300 (n%)	64 (21.3)	236 (78.7)
Sex/Pharmacist			
Male	41 (58.6)	11 (15.7)	30 (42.9)
Female	29 (41.4)	7 (10)	22 (31.4)
	N:70 (n%)	18 (25.7)	52 (74.3)

**Table 3 (continue).** *S. aureus* carriage rates and risk factors

Sex/Pharmacy Personnel	Total	Positive	Negative
Male	162 (70.4)	33 (14.3)	129 (56.1)
Female	68 (29.6)	13 (5.7)	55 (23.9)
	N: 230 (n%)	46 (20)	184 (80)
<b>Diabetes</b>			
Yes	8 (2.7)	4 (50)	4 (50)
No	292 (97.3)	60 (20.55)	232 (79.45)
	N: 300 (n%)	64 (21.3)	236 (79.7)
<b>Antibiotic use in last one month</b>			
Yes	96 (32)	18 (18.75)	78 (81.25)
No	204 (68)	46 (22.55)	158 (77.45)
	N: 300 (n%)	64 (21.3)	236 (79.3)
<b>Smoking</b>			
Yes	64 (21.3)	23 (35.94)	41 (64.06)
No	236 (78.7)	41 (17.37)	195 (82.63)
	N: 300 (n%)	64 (21.3)	236 (79.7)
<b>Outpatient treatment in hospital within the past year</b>			
Yes	76 (25.33)	46 (60.52)	30 (39.48)
No	224 (74.67)	18 (8.03)	206 (91.97)
	N: 300 (n%)	64 (21.3)	236 (79.7)

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Sivas Cumhuriyet University and Sivas Cumhuriyet University Scientific Research Projects for their financial support to this study (Project No: ECZ-010). We thank the volunteers who participated in our study.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: H.B., S.Y.; Design: H.B.; Control: S.Y.; Sources: H.B.; Materials: H.B., S.Y.; Data Collection and/or Processing: H.B., S.Y.; Analysis and/or Interpretation: H.B., S.Y.; Literature Review: H.B., S.Y.; Manuscript Writing: H.B., S.Y.; Critical Review: H.B., S.Y.; Other: H.B., S.Y.

## CONFLICT OF INTEREST

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

## ETHICS COMMITTEE APPROVAL

Ankara University Faculty of Medicine Clinical Research Ethics Committee. No: 04-177-14. 10.3.2014.

## REFERENCES

1. Boisset, S., Saadatian-Elahi, M., Landelle, C., Bes, M., Gustave, C.A., Tristan, A., Fassier, J.B., Laurent, F., Grando, J., Vandenesch, F., Bouchiat, C. (2019). Unexpected categories at risk of *S. aureus* nasal carriage among hospital workers. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 222(8), 1093-1097. [\[CrossRef\]](#)
2. Emaneini, M., Jabalameli, F., Rahdar, H., Leeuwen, W., Beigverdi, R. (2017). Nasal carriage rate of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among Iranian healthcare workers: A systematic review and meta-analysis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50(5), 590-597. [\[CrossRef\]](#)
3. Kwiecinski, J.M., Horswill, A.R. (2020). *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: Pathogenesis and

- regulatory mechanisms. *Current Opinion in Microbiology*, 53, 51-60. [\[CrossRef\]](#)
4. Wertheim, H.F., Vos, M.C., Ott, A., van Belkum, A., Voss, A., Kluytmans, J.A., van Keulen, P.H., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Meester, M.H., Verbrugh, H.A. (2004). Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *The Lancet*, 364(9435), 703-705. [\[CrossRef\]](#)
  5. Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., Nouwen, J.L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 5(12), 751-762. [\[CrossRef\]](#)
  6. Gul M, Çıragil P, Aral M. (2004). *Staphylococcus aureus* nasal and hand carriage in hospital staff of medical faculty of Kahramanmaraş Sutcu Imam University. *Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği Dergisi*, 18, 36-39.
  7. Albrich, W.C., Harbarth, S. (2008). Health-care workers: Source, vector, or victim of MRSA? *The Lancet Infectious Diseases*, 8(5), 289-301. [\[CrossRef\]](#)
  8. Chen, K.H., Chuang, W.C., Wong, W.K., Chuang, C.H., Chen, C.J., Huang, Y.C. (2020). Nasal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage among foreign workers recruited to Taiwan from southeastern asian countries. *Open Forum Infectious Diseases*, 8(1), ofaa586. [\[CrossRef\]](#)
  9. Vazquez-Guillamet, C., Kollef, M.H. (2014). Treatment of gram-positive infections in critically ill patients. *Boston Medical Center infectious diseases*, (14), 92. [\[CrossRef\]](#)
  10. Boyce, J.M., Pittet, D. (2002). Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee, HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 23(S12), S3-S40. [\[CrossRef\]](#)
  11. Cirkovic, I., Stepanovic, S., Skov, R., Trajkovic, J., Grgurevic, A., Larsen, A.R. (2015). Carriage and genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among patients and healthcare workers in a serbian university hospital. *PloS One*, 10(5), e0127347. [\[CrossRef\]](#)
  12. Akhtar N. (2010). Staphylococcal nasal carriage of health care workers. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*, 20(7), 439-443.
  13. Calfee, D.P., Salgado, C.D., Classen, D., Arias, K.M., Podgorny, K., Anderson, D.J., Burstin, H., Coffin, S.E., Dubberke, E.R., Fraser, V., Gerding, D.N., Griffin, F.A., Gross, P., Kaye, K.S., Klompas, M., Lo, E., Marschall, J., Mermel, L.A., Nicolle, L., Pegues, D.A., Yokoe, D.S. (2008). Strategies to prevent transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in acute care hospitals. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 29 Suppl (1), S62-S80. [\[CrossRef\]](#)
  14. Kloos W, Lambe D. (1991). *Staphylococcus*. In: A. Barlows, W.J. Hausler, K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, H.J. Shadomy (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, (pp. 222-237) 5<sup>th</sup> ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology.
  15. CLSI. (2012). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-9<sup>th</sup> ed.*, CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, USA.
  16. Okamoto, R., Okubo, T., Inoue, M. (1996). Detection of genes regulating beta-lactamase production in *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(11), 2550-2554. [\[CrossRef\]](#)
  17. Araj, G.F., Talhouk, R.S., Simaan, C.J., Maasad, M.J. (1999). Discrepancies between *mecA* pcr and conventional tests used for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11, 47-52. [\[CrossRef\]](#)
  18. Price, J.R., Cole, K., Bexley, A., Kostiou, V., Eyre, D.W., Golubchik, T., Wilson, D.J., Crook, D.W., Walker, A.S., Peto, T., Llewelyn, M.J., Paul, J. (2017). Modernising Medical Microbiology informatics group Transmission of *Staphylococcus aureus* between health-care workers, the environment, and patients in an intensive care unit: a longitudinal cohort study based on whole-genome sequencing. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(2), 207-214. [\[CrossRef\]](#)
  19. Rashid, Z., Farzana, K., Sattar, A., Murtaza, G. (2012). Prevalence of nasal *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital personnel and associated risk factors. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 69(5), 985-991.
  20. Garcia, C., Acuna-Villaorduna, A., Dulanto, A., Vandendriessche, S., Hallin, M., Jacobs, J., Denis, O. (2016). Dynamics of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthcare workers in a tertiary-care hospital in Peru. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(1), 89-93. [\[CrossRef\]](#)
  21. Genc, O., Arıkan, I. (2020). The relationship between hand hygiene practices and nasal *Staphylococcus aureus* carriage in healthcare workers. *La Medicina del Lavoro*, 111(1), 54-62. [\[CrossRef\]](#)



22. Hefzy, E.M., Hassan, G.M., Abd El Reheem, F. (2016). Detection of panton-valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage among Egyptian health care workers. *Surgical Infections*, 17(3), 369-375. [\[CrossRef\]](#)
23. Chen, B., Dai, X., He, B., Pan, K., Li, H., Liu, X. (2015). Differences in *Staphylococcus aureus* nasal carriage and molecular characteristics among community residents and healthcare workers at Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Southern China. *Boston Medical Center Infectious Diseases*, 15, 303. [\[CrossRef\]](#)
24. de Benito, S., Alou, L., Becerro-de-Bengoa-Vallejo, R., Losa-Iglesias, M.E., Gomez-Lus, M.L., Collado, L., Sevillano, D. (2018). Prevalence of *Staphylococcus* spp. nasal colonization among doctors of podiatric medicine and associated risk factors in Spain. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7, 24. [\[CrossRef\]](#)
25. Kampf, G., Adena, S., Rüdén, H., Weist, K. (2003). Inducibility and potential role of *mecA*-gene-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from colonized healthcare workers as a source for nosocomial infections. *The Journal of Hospital Infection*, 54(2), 124-129. [\[CrossRef\]](#)
26. Ibarra, M., Flatt, T., Van Maele, D., Ahmed, A., Fergie, J., Purcell, K. (2008). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in healthcare workers. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 27(12), 1109-1111. [\[CrossRef\]](#)
27. Buenaventura-Alcazaren, F.A., Dela Tonga, A., Ong-Lim, A., Destura, R.V. (2020). Prevalence and molecular characteristics of MRSA nasal carriage among hospital care workers in a tertiary hospital in the Philippines. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 53(5), 739-745. [\[CrossRef\]](#)
28. Alp, E., Damani, N. (2015). Healthcare-associated infections in intensive care units: Epidemiology and infection control in low-to-middle income countries. *Journal of Infection in Developing Countries*, 9(10), 1040-1045. [\[CrossRef\]](#)
29. McEachern, E.K., Hwang, J.H., Sladewski, K.M., Niciatia, S., Dewitz, C., Mathew, D.P., Nizet, V., Crotty Alexander, L.E. (2015). Analysis of the effects of cigarette smoke on staphylococcal virulence phenotypes. *Infection and Immunity*, 83(6), 2443-2452. [\[CrossRef\]](#)
30. Giri, N., Maharjan, S., Thapa, T.B., Pokhrel, S., Joshi, G., Shrestha, O., Shrestha, N., Rijal, B.P. (2021). Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthcare workers in a tertiary care hospital, Kathmandu, Nepal. *International Journal of Microbiology*, 8825746. [\[CrossRef\]](#)
31. Anafo, R.B., Atiase, Y., Kotey, F., Dayie, N., Tetteh-Quarcoo, P.B., Duodu, S., Osei, M.M., Alzahrani, K.J., Donkor, E.S. (2021). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nasal carriage among patients with diabetes at the Korle Bu Teaching Hospital. *PloS One*, 16(9), e0257004. [\[CrossRef\]](#)
32. Huifen Y, Junshao Z, Wenzhou Q (2015). Study on colonization status and risk factors of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in patients of intense care units. *Chinese Journal of Disinfection*, 32, 24-26.
33. Chen, C.C., Pass, S.E. (2013). Risk factors for and impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization in patients in a medical intensive care unit. *American Journal of Infection Control*, 41(11), 1100-1101. [\[CrossRef\]](#)
34. Stenstrom, R., Grafstein, E., Romney, M., Fahimi, J., Harris, D., Hunte, G., Innes, G., Christenson, J. (2009). Prevalence of and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infection in a Canadian emergency department. *Canadian journal of Emergency Medical Care*, 11(5), 430-438. [\[CrossRef\]](#)
35. Ahluwalia, A., Sood, A., Sood, A., Lakshmy, R., Kapil, A., Pandey, R.M. (2000). Nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in patients with diabetes mellitus. *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*, 17(6), 487-488.
36. Hart, J., Hamilton, E.J., Makepeace, A., Davis, W.A., Latkovic, E., Lim, E.M., Dyer, J.R., Davis, T.M. (2015). Prevalence, risk factors and sequelae of *Staphylococcus aureus* carriage in diabetes: The Fremantle Diabetes Study Phase II. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 29(8), 1092-1097. [\[CrossRef\]](#)





## BEYİN YAŞLANMASINDA MOLEKÜLER MEKANİZMALAR

### MOLECULAR MECHANISMS IN BRAIN AGING

Esra ÖZDEK<sup>1\*</sup> , Sevtap HAN<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Ana Bilim Dalı, 06330, Ankara, Türkiye

#### ÖZ

**Amaç:** Bu derlemede beyinde yaşlanmayla birlikte oluşan moleküler değişimlerin anlatılması amaçlanmıştır. Beyin yaşlanmasının moleküler mekanizmaları; oksidatif stres, mitokondri işlev bozukluğu, endoplazmik retikulum stres, otofaji, inflamasyon, lizozom ve proteazom işlevinin bozulması, bozulmuş DNA onarımı başlıkları altında toplanmış ve bu konulara odaklanılmıştır.

**Sonuç ve Tartışma:** Yaşlanma, muhtemelen organizmalardaki hasar birikiminden ve/veya bakım ve onarım mekanizmalarındaki düşüşten kaynaklanan çok faktörlü bir süreçtir. Yaşlanmayla birlikte beyinde de nöronlarda dejenerasyon, beyin hacminin azalması, beyin hücrelerinin azalması gibi yapısal ve öğrenme, hafıza, dikkat ve motor aktivitede düşüşler gibi işlevsel birçok değişim meydana gelmektedir. Bu değişiklikler nörodejeneratif bozukluklarla birlikte Alzheimer, Parkinson gibi hastalıklara yatkınlık oluşturmaktadır. Beyin yaşlandığında öğrenme, karar verme, hafıza gibi yeteneklerinde azalmalar görülmektedir. Beyin yaşlanmasına bağlı hastalıklara ve işlevsel bozukluklara karşı terapötik veya koruyucu yaklaşımlar geliştirmek için beyin yaşlanmasının moleküler düzeydeki mekanizmalarının aydınlatılmasına ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Beyin, nörodejenerasyon, yaşlanma

#### ABSTRACT

**Objective:** In this review, it is aimed to explain the molecular changes that occur with aging in the brain. The molecular mechanisms of brain aging are grouped under the headings of oxidative stress, mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress, autophagy, inflammation, disruption of lysosome and proteasome function, and impaired DNA repair and focused on these issues.

**Result and Discussion:** Aging is a multifactorial process, possibly resulting from accumulation of damage in organisms and/or decline in maintenance and repair mechanisms. With aging, many structural changes such as degeneration of neurons, decrease in brain volume, decrease in brain cells and functional changes such as decreases in learning, memory, attention, and motor activity occur in the brain. These changes create a predisposition to diseases such as Alzheimer's and Parkinson's along with neurodegenerative disorders. As the brain ages, its abilities such as learning, decision making and memory decrease. To develop therapeutic or protective approaches against

\* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Esra Özdek  
e-posta / e-mail: esra.ozdek@saglik.gov.tr, Tel. / Phone: +05378994050

*brain aging-related diseases and functional disorders, there is a need to elucidate the molecular-level mechanisms of brain aging.*

**Keywords:** Aging, brain, neurodegeneration

## GİRİŞ

İlerleyen yaşla birlikte diğer organ sistemlerinde olduğu gibi, beynin işlevsel yetenekleri de giderek azalmaktadır [1]. Yaşlanma sırasında öğrenme ve hafıza, dikkat, karar verme hızı, duyuşsal algı ve motor aktivitede düşüşler şeklinde kendini gösteren koordinasyon bozukluğu meydana gelmektedir. Yaşlanma sonucu bireyler, nörodejeneratif bozuklukların gelişmesine daha yatkın hale gelirler. Bununla birlikte Alzheimer ve Parkinson hastalıkları giderek daha yaygın olarak görülür [2, 3, 4].

İnsan yaşlanması tüm organizmayı etkiler, ancak beynin yaşlanması şüphesiz diğer tüm organlarınkinden farklı olmalıdır, çünkü nöronlar yüksek oranda farklılaşmış postmitotik hücrelerdir ve çoğu için doğum sonrası dönemdeki yaşam süresi tüm organizmanın ömrüne eşittir [5].

Birçok yaşlanma teorisi vardır ancak hepsi temelde iki gruba ayrılabilir: yaşlanma, genetik olarak programlanmış bir süreçtir ve yaşlanma, organizmanın yaşamsal faaliyetleri sonucunda zamanla kademeli olarak zarar görmesiyle oluşan rastgele bir süreçtir [6]. Yaşlanan beyin hücresel ve moleküler seviyelerde incelendiğinde; mitokondri işlev bozukluğu, oksidatif hasar görmüş moleküllerin hücre içi birikimi, hücresel atık imha mekanizmalarında (otofaji) bozulma, katlanmamış protein yanıtı (UPR) gibi adaptif stres tepkilerinde bozulma ve DNA tamir mekanizmalarında bozulma olduğu görülmektedir. Sayılan moleküler mekanizmalar Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıkların ortak patofizyolojik mekanizmaları olarak kabul edilmektedir. Bu derlemede beyinde yaşlanmasıyla birlikte oluşan değişimlerin moleküler mekanizmalarına değinilmiştir.

## Moleküler Mekanizmalar

### *Oksidatif Stres*

Oksidatif stres kardiyovasküler hastalıklardan Alzheimer hastalığına kadar yaşlanmaya bağlı birçok hastalığın altında yatan nedenlerden biridir. Hücrede enerji üretimi reaksiyonları sırasında serbest radikaller (reaktif oksijen ve nitrojen türleri (RONS)) üretilmektedirler. Antioksidan sistemler yeterli çalıştığında oluşan bu zararlı serbest radikaller ortadan kaldırılmaktadırlar. Fakat serbest radikallerin artışına neden olan durumlarda veya antioksidan sistemlerin yeterli işlev gösteremediği durumlarda serbest radikal/antioksidan kapasite dengesi bozulmakta ve oksidatif stres meydana gelmektedir. Yaşlanmayla birlikte de RONS ile bunların olumsuz etkilerini ortadan kaldıran antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengesizlik sonucu oksidatif stres miktarı artmaktadır. Oksidatif stres teorisine göre, yaşa bağlı işlevsel kayıplar RONS artışı nedeniyle oluşan hasarların birikmesinden kaynaklanmaktadır [7].

Reaktif oksijen türleri (ROS), fizyolojik işlev için gerekli olan ancak yüksek seviyelerde toksik olabilen metabolik yan ürünlerdir. Bu oksidatif stres faktörlerinin seviyeleri yaşam boyunca kademeli olarak artmakta, mitokondri işlevini bozmakta ve vücudun tüm bölümlerine, özellikle merkezi sinir sistemine zarar vermektedir [8]. Elde edilen sonuçlar, beyinde oksidatif stres artışının bilişsel yaşlanmaya ve Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklara neden olan anahtar mekanizmalardan biri olabileceğini düşündürmektedir [8].

Yaşlanma ve yaşa bağlı nörodejeneratif bozuklukları taklit eden hayvan modelleri, bu bozukluklarda oksidatif stresin rolünü incelemek için kullanılmaktadır [9]. Birçok araştırma, D-galaktoz (D-gal) enjeksiyonunun, tipik olarak beyin hasarı ile ilişkili olan doğal yaşlanmayı taklit edebileceğini göstermiştir. Zhang ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, D-Gal uygulamasıyla yaşlanan farelerde; lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerden biri olan ve oksidatif hasar göstergesi olarak kullanılan malondialdehit (MDA) ve Asetil kolinesteraz (AChE) aktivitelerinde artış, antioksidan savunma sisteminin üyeleri olan Katalaz (CAT) ve Süperoksit Dismutaz (SOD) miktarlarında azalma görülmüştür. Yaşlılarda Bcl-2 ilişkili X protein (Bax) ve Caspase 3 protein ekspresyonları artmış, Bcl-2 protein ekspresyonu ise azalmıştır. Bax proteini ER stresi ile indüklenir ve aktive olması apoptoza

aracılık eder. Caspase 3 hücre ölümü sürecini kontrol eden bir proteazdır. Hücrenin hayatta kalmasını sağlayan bir apoptoz inhibitörü olan Bcl-2 proteini ise apoptoz ve otofaji gibi mekanizmalarda rol alır. Sonuç olarak; farelere uzun süreli D-Gal uygulamasının aşırı otofajiye ve nöronal hasara yol açan hücre apoptozuna neden olduğu anlaşılmıştır. [10]. D-gal, beyin de dâhil olmak üzere birçok dokuda oksidatif stresi artırmaktadır. D-gal'ın beyin yaşlanması için hayvan modeli olarak kullanıldığı başka bir çalışmada beyin MDA ve Protein Karbonil (PC) seviyelerini artırdığı, SOD ve antioksidan Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)'ı önemli ölçüde azalttığı; ancak antioksidan Glutasyon transferaz (GST) aktivitelerini azaltmadığı bulunmuştur. Ayrıca D-gal uygulaması histopatolojik değişikliklere ve apoptoza neden olmuştur [11]. Singh ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; yaşlanmanın sıçanların beyinde oksidatif stres, apoptotik hücre ölümü, nöroinflamasyon ve nörodejenerasyona neden olduğu gösterilmiştir [12].

Garg ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada; beyin dokusunda SOD, CAT, Glutasyon (GSH) ve toplam tiyol gibi enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar, PC, gelişmiş oksidasyon protein ürünleri (AOPP), ROS ve MDA gibi prooksidanlar değerlendirilmiştir. Ayrıca AChE aktivitesi ölçülmüş ve gen ekspresyonu çalışmaları yapılmıştır. Yaşlanma ile birlikte Non-protein thiol (Np-SH) ve toplam tiyol düzeyinde anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir. SOD ve CAT gibi enzimatik antioksidanların düzeyinde de önemli ölçüde azalma olduğu bulunmuştur. ROS ve MDA düzeyinde, PC ve AOPP seviyelerinde önemli bir artış gözlenmiştir. AChE aktivitesinde ise önemli bir düşüş kaydedilmiştir [13]. Genç sıçanlarla karşılaştırıldığında, yaşlı sıçan beyinde toplam ve fosforile endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) seviyeleri önemli ölçüde azalmıştır. Bu durum artan Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (NADPH) oksidaz (ana bir serbest radikal kaynağı) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir [14]. Benzer şekilde diğer bir çalışmada; yaşlılar sıçanların hipokampusundaki MDA düzeyi artmış ve SOD aktivitesi önemli ölçüde azalmıştır [15].

### **Mitokondri İşlev Bozukluğu**

Yaşlanmanın karakteristik özelliklerinden biri mitokondri işlev bozukluğudur. Bozulmuş elektron transferi ve oksidatif hasar ile karakterize mitokondri işlev bozukluğu beyin yaşlanması ve nörodejenerasyona neden olmaktadır [16]. Mitokondri işlev bozukluğu, Alzheimer hastalığı da dahil olmak üzere birçok yaygın nörodejeneratif hastalığın altında yatan nedenlerdendir [17]. Mitokondri işlev bozukluğuyla birlikte; mitokondri membran potansiyelinde ve geçirgenliğinde değişimler, enzim aktivitelerinde azalma, mitokondri dinamiklerinde ve mitokondri elektron taşıma zincirinde dengesizlikler görülmektedir.

Yaşlı sıçanların beyinlerinde mitokondri membran geçirgenliğinin, membran potansiyelinin ve mitokondri enzim aktivitelerinin önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur [18]. Benzer şekilde başka bir çalışmada; yaşlı hayvanların beyin mitokondrilerinde kompleks I ve IV'te elektron transfer oranlarında azalma, membran potansiyelinde azalma, fosfolipid ve proteinlerin oksidasyon ürünlerinin içeriğinde artış gözlenmiştir. Bu bozulmalar; Kompleks I inaktivasyonu ve oksidatif hasar ile birlikte "kompleks I sendromu" olarak adlandırılmakta ve memeli beyin yaşlanmasının ve nörodejeneratif hastalıkların bir özelliği olarak kabul edilmektedir [16].

Füzyon (iki mitokondrinin birleşmesi) ve fisyon (mitokondri bölünmesi) gibi mitokondri dinamiklerinin dengesizliği nörodejeneratif hastalıklara yol açabilmektedir. Li ve ark. çalışmalarında; mitokondride fisyonla ilgili proteinlerden olan fisyon 1 proteini (FIS1) ve dinamin benzeri protein (DRP1)'in yaşlı farelerin hipokampus ve serebral korteksinde önemli ölçüde arttığını bulmuştur. Yaşlanmayla birlikte görülen FIS1 and DRP1 proteinlerindeki artışın beyin mitokondri dinamiklerinin düzensizliğine neden olacağı düşünülmüştür [19]. Esansiyel bir glikolitik enzim olan fosfogliserat mutaz 1 (PGAM1), genç farelere kıyasla yaşlıların hipokampusunda artmıştır. Bununla birlikte, bir heterooligomer kompleksi olan mitokondri kaynaklı piruvat taşıyıcı 2 (MPC2), yaşlı farelerin serebral korteksinde azalmıştır. Glikoliz (PGAM1), piruvat oksidasyonu ve karboksilasyonu (MPC2) ve oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) da dahil olmak üzere birçok enerji metabolizması yolundaki anormal değişiklikler, fare yaşlanması sırasında beyin enerji metabolizmasında yaygın bir bozulmanın meydana geldiğini düşündürmektedir. Mitokondri elektron taşıma zincirinin bir süreci olan oksidatif fosforilasyon, ATP üretme sürecinde önemlidir. Ancak yaş arttıkça elektronlar sızmakta ve reaktif oksijen türleri artmaktadır. Bu durum mitokondri işlev bozukluğuna ve oksidatif stres artışına neden

olmaktadır [19].

Diğer taraftan, mitokondri işlev bozukluğunun Alzheimer dâhil olmak üzere bazı nörodejeneratif hastalıkların patolojik özelliklerinden biri olan beyaz cevher dejenerasyonunun altında yatan mekanizmalardan biri olduğu öne sürülmektedir. Yapılan analizler, kadın beyininin yaşlanması sırasında mitokondride solunumda azalma, aşırı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimi ve sitozolik-fosfolipaz-A2 sfingomiyelinaz yolunda aktivasyon olduğunu ve bu üç olayın miyelin dejenerasyonunu hızlandırdığını göstermiştir. Ayrıca yağ asitlerinde, mitokondride yağ asidi metabolizmasında ve beyin keton cisimlerinde artış, plazma keton cisimlerinde ise düşüş görülmüştür. Sonuç olarak, yaşlanma sürecinin başlarında beyindeki mitokondri işlev bozukluğunun daha sonraki aşamada beyaz cevher dejenerasyonuna yol açtığı düşünülmüştür [20].

### **Endoplazmik Retikulum Stresi**

Endoplazmik retikulum (ER) protein katlanması, lipit biyosentezi ve kalsiyum depolamasının gerçekleştiği çok işlevli bir organdır [21]. Hücrede eksprese edilen tüm proteinlerin yaklaşık üçte birinden fazlasının sentezi, katlanması ve yapısal olgunlaşmasında önemli rol oynamaktadır. ER'de özellikle, plazma zarında, golgi aygıtında ve lizozomlarda kalması hedeflenen hemen hemen tüm proteinler translayona uğramaktadır [22].

Enerji veya besin tükenmesi, kalsiyum veya redoks durumundaki düzensizlikler, yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi gibi ER homeostazını bozan durumlar ER stresine ve katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak adlandırılan sinyal yolunun aktivasyonuna yol açmaktadır. UPR aktive olduğunda şaperonların miktarı artırılmakta, yanlış katlanmış proteinlerin parçalanması artmakta ve protein translayonu azalmaktadır. Böylece UPR, hücrel homeostazın korunmasında temel bir rol oynamaktadır [21].

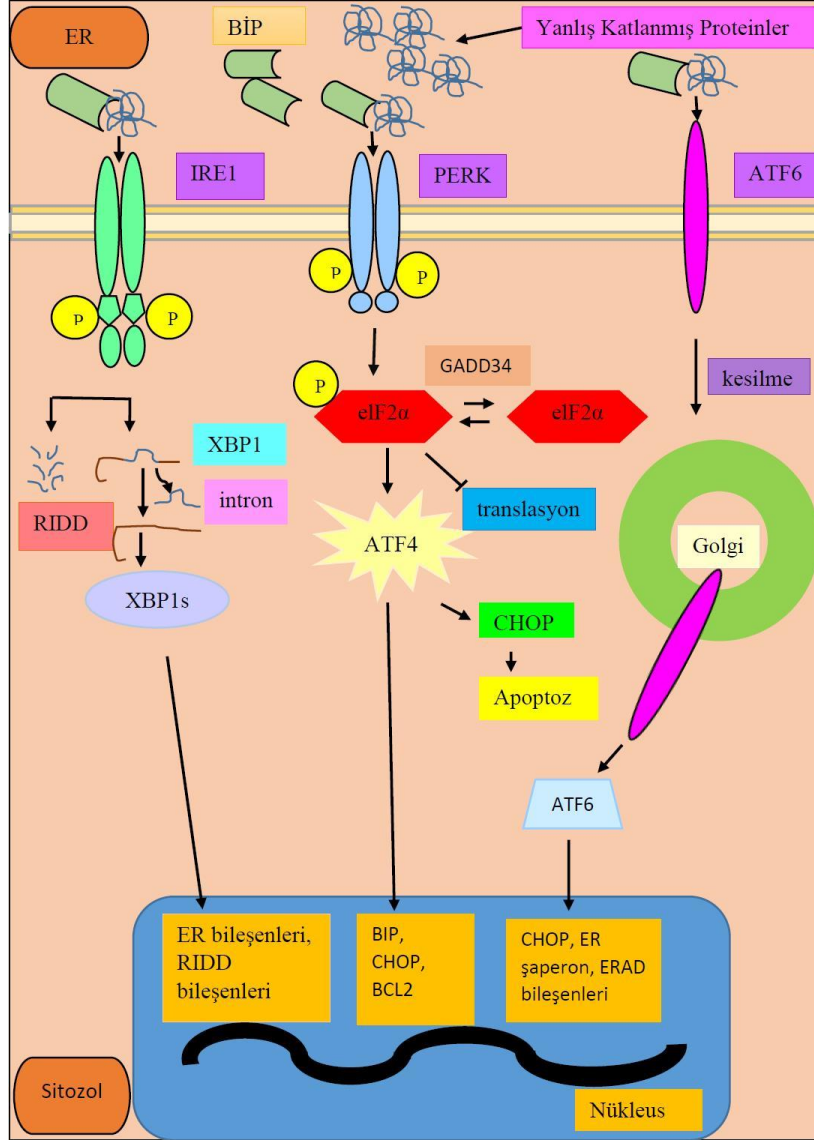
Memelilerde ER zarıyla ilişkili üç protein, ER stres sensörleri görevi görür. Bunlar: (1) inositol gerektiren transmembran kinaz/endoribonükleaz 1 (IRE1); (2) çift sarmallı RNA (PKR) ile aktive olan protein kinaz benzeri ökaryotik başlatma faktörü 2 $\alpha$  kinaz (PERK); ve (3) aktive edici transkripsiyon faktörü-6 (ATF6)'dır [23]. Her UPR sensörü, ER şaperonu olan Bağlanma İmmunoglobulin Proteini (BiP, GRP78)'e bağlı haldedir. ER'de yanlış katlanmış proteinler biriktiğinde BiP'e bağlanırlar ve BiP, UPR sensörlerinden ayrılır. Böylece UPR sensörleri aktive olurlar [24, 25, 26]. UPR, ER lümeni içindeki protein katlanma koşullarını sürekli olarak denetlemekte ve ER homeostazını sürdürmek için gereken mekanizmaları başlatmaktadır. UPR hafif veya orta düzeyde ER stresi altında, hücreyi adaptasyon ve hayatta kalmaya teşvik eden transkripsiyonel ve translayonel değişiklikleri harekete geçirmektedir [27] (Şekil 1).

Bununla birlikte, hücrede homeostazı sağlamak her zaman mümkün olmamakta ve uzun süreli ER stresi hücrede apoptoza yol açmaktadır. Yaşlanmaya bağlı olarak ER şaperonlarının ve katlama enzimlerinin ekspresyonundaki ve aktivitesindeki düşüşler, proteinlerin düzenli katlanmasını ve UPR'nin tetiklenmesini bozabilmektedir. Hücrel işlevlerindeki yaşa bağlı azalmaları açıklayan mekanizmalardan biri de, hücre homeostazını sağlayan UPR gibi sistemlerin aktivasyonlarının yeterli seviyede olmaması ve bu sistemlerin başarısız olmasıdır. Bu durumda hücre homeostazı bozulmakta ve hücrede işlev kayıpları görülebilmektedir. Alzheimer, Parkinson ve tip II diyabet gibi yaşlılıkta ortaya çıkan hastalıkların çoğunda, proteinler veya protein parçaları normalde çözünür formlarından karaciğer, beyin ve dalak gibi çeşitli organlarda biriken çözünmeyen fibrillere veya plaklara dönüşürler. UPR, bu nörodejeneratif ve genetik hastalıkların yanı sıra çeşitli kanserlerde ve diyabet, ateroskleroz, enflamatuar bağırsak hastalığı ve artrit gibi bir dizi enflamatuar hastalıkta rol oynamaktadır [21].

Yaşlanma ile birlikte ER protein homeostazında (proteostaz) bozulma ve sonrasında ER stres oluşmaktadır. ER stress ise birçok hastalık için önemli bir risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır [28]. UPR cevabının doğru ve yeterli bir şekilde çalışması ve protein homeostazının sağlanması nöronların işlevleri açısından önemlidir. Yapılan çalışmalarda, UPR aktivasyonunun yaşa bağlı olarak değiştiği ve bu durumun yaşlanma sırasında önemli bir rol oynadığı öne sürülmektedir.

BiP/GRP78 ER şaperonlarından ve UPR'nin en önemli düzenleyicilerinden biridir. BiP/GRP78'in ekspresyon miktarlarının yaşlanma ile birlikte azalması ER homeostazını bozmaktadır. Oh ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada; yaşlanma ile birlikte dorsal hipokampusta BiP/GRP78 ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir [29]. Başka bir çalışmada; yaşlı farelerin serebral korteksinde

BiP/GRP78'in bazal ekspresyonunda azalma, Büyüme Durdurma ve DNA Hasarını İndükleyebilir Protein 34 (GADD34) seviyelerinde artış ve proapoptotik proteinlerle ilişkili eIF2 fosforilasyonunda azalma gözlenmiştir [30]. Genç sıçanların beyin dokularında BiP/GRP78 ekspresyonunun yaşlı sıçanların dokularına kıyasla daha fazla olduğu bulunmuştur [31].



Şekil 1. UPR Yoluğu şematik gösterimi

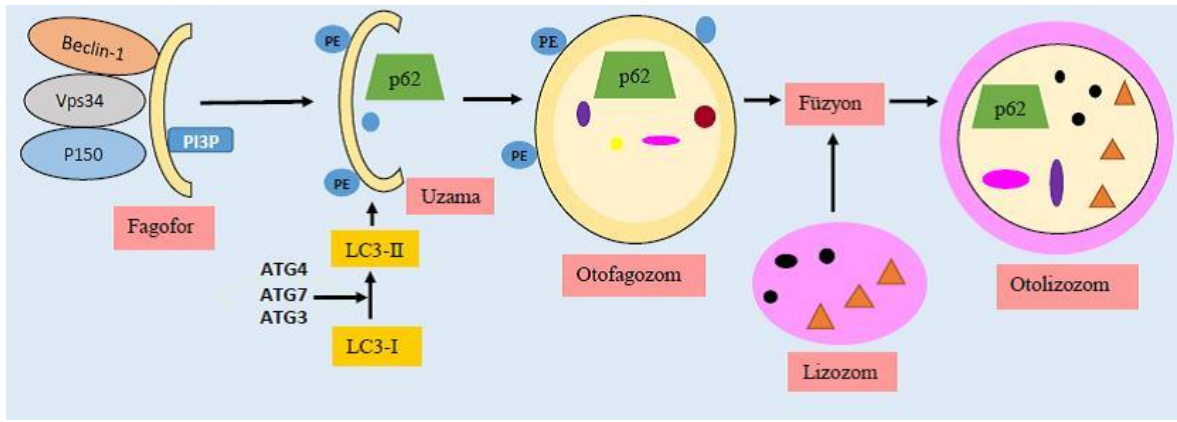
### Otofaji

Yaşlanmayla birlikte hücrelerde zarar görmüş organeller ve anormal proteinler birikmektedir. Hücre homeostazının korunması için sitoplazmada bulunan hasarlı yapıların ortadan kaldırılması önemlidir. Otofaji, bu yapıların parçalandığı bir yolak oluşturarak hücre homeostazına katkı sağlamaktadır. Otofaji, esas olarak kritik zamanlarda enerji kaynaklarını dengelemek için yapılan kendini yıkım süreci olarak da tanımlanabilir. Beyinde toksik moleküllerin ve hasarlı organellerin otofaji ile lizozoma iletilmesinin nöron sağlığı için önemli olduğu görülmektedir [32]. Ancak yaşlanmayla birlikte otofajinin zayıfladığı düşünülmektedir [33].

Otofaji süreci fagoforun gelişimi ile başlamakta, ardından otofagozomun oluşmakta ve otofagozomla lizozomun füzyonu ile tamamlanmaktadır. Beclin kompleksinin aktivitesi,

fosfatidilinositol-3-fosfatın (PI3P) lokal olarak fagoforda toplanmasını sağlamaktadır. LC3 fagoforun uzaması sırasında; ATG4 ve ardından ATG3 ve ATG7 yoluyla fagofor membranı üzerindeki fosfatidiletanolamin (PE) ile konjuge olmaktadır. Bu otofagozomu oluşturmak için gerekli olan adımdır. Lizozomun otofagozom ile füzyonundan sonra ise lizozomal proteazlar otofagosomal içeriği parçalamaktadırlar (Şekil 2).

Otofaji değerlendirilirken ATG ve LC3 gibi otofaji ile ilgili genlerin veya LC3-II, Beclin1 ve P62 gibi proteinlerin ekspresyonları incelenmektedir. P62, otolizozomlar tarafından bozulan bir proteindir. Otofajinin ilerlemesi, LC3-II'nin artmasına ve P62'nin azalmasına sebep olmaktadır. Yaşlı sıçanların karaciğer dokularında LC3-II'nin ekspresyonu azalmış ve P62 ekspresyonu artmıştır [34]. Beclin 1 makro-otofajinin başlatılması ve düzenlenmesinde rol oynayan lipid-kinaz kompleksinin önemli bir üyesidir [35]. Genç yetişkinlere kıyasla yaşlıların endotel hücrelerinde beclin 1 protein ekspresyonunun daha düşük, P62 seviyelerinin ise daha yüksek olduğu bulunmuştur [36]. Yaşlanan sıçanların hipokampal dokularında LC3-II/LC3-I oranının ve ATG7'nin azaldığı, p62 protein düzeylerinin arttığı görülmüştür [37].



Şekil 2. Otofaji yolu şematik gösterimi

## ***Inflamasyon***

Beyin yaşlanmasında da diğer organ sistemlerine benzer şekilde lokal inflamasyon görülmektedir [1]. Elde edilen kanıtlar, inflamasyonun hem yaygın hem de nadir görülen nörolojik hastalıkların patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Özellikle Alzheimer hastalığı, vasküler demans, Parkinson hastalığı ve multipl sklerozun (MS) nörodejeneratif süreçleri, immün düzensizlik ile birlikte nöroinflamasyon ile ilgilidir [38].

Beyinde yaşa bağlı gelişen inflamasyonda rolü olan hücrelerden bir mikrogliyalardır. Mikroglia, merkezi sinir sisteminin yerleşik bağışıklık hücresidir ve beyin homeostazının korunmasında önemlidir. Yaşlı beyindeki glial hücreler, özellikle mikroglialar, interlekin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 ve tümör nekroz faktörü  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimi ile karakterize edilen bir durum sergilemektedir [39]. Mikroglia, yaşlanan beyinde ve nörodejenerasyon durumunda homeostazı sağlama özelliğini kaybetmektedir [40]. Böylece mikroglia yaşla birlikte giderek işlevsiz hale gelmektedir. Bu hücreler ile birçok nörodejeneratif hastalığın patogenezi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir [41]. Fare ve insan beyinde yapılan bir çalışmada, yaşlanma ile birlikte mikrogliada lipid damlacıkları birikimi olduğu rapor edilmiştir. Lipid damlacık biriktiren mikroglia (LDAM) hücreleri yüksek düzeyde ROS üretmekte ve proinflamatuvar sitokinler salgılamaktadırlar [41]. Yaşlı farelerde Sisteinil-tRNA Sentetaz (CARS+) lipid depolayan mikroglia sayısının genç farelere göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur [41].

Yaşla birlikte artan inflamasyon beyin bilişsel yeteneklerinde azalmaya neden olmaktadır. Corlier ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada; periferik inflamasyonun yaşa bağlı beyin gerilemesini desteklediği anlaşılmıştır [42]. Yaşlı erişkinlerdeki beyin atrofisinde ve bilişsel değişimlerde,

inflamasyonun ve inflamasyonla ilişkili amiloid- $\beta$  (A $\beta$ ) birikiminin rolü olduğu gösterilmiştir [43]. Beyinde TNF- $\alpha$  seviyelerindeki lineer artışla, gri madde hacmindeki düşüşün ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca TNF- $\alpha$ 'nın ve Mini-Zihinsel Durum Muayenesi puanlarının değişimi arasında da negatif doğrusal bir ilişki olduğu gösterilmiştir [44]. Diğer taraftan yaşlı sıçanlardaki uzun süreli hafıza bozukluklarına, hem hipokampus hem de amigdaladaki IL-1 $\beta$  proteini artışlarının eşlik ettiği görülmüştür [45].

### ***Lizozom ve Proteazom İşlevinde Bozulma***

Strese başarılı bir şekilde yanıt verebilmek için hücrelerdeki proteazomal ve lizozomal proteolitik yolların çalışmaya devam etmesi gereklidir. Araştırmalar, bu yollar aracılığıyla gerçekleşen protein döngüsünde yaşa bağlı bozulmalar olduğunu göstermektedir. Proteoliz olayındaki yaşa bağlı değişikliklerin; protein oksidasyonunda, protein agregasyonunda ve sitotoksitede artış gibi çok çeşitli nöropatolojik durumlara katkıda bulunduğu düşünülmektedir [46]. Yaşla birlikte oksitlenmiş protein birikimi; artan protein hasarına ve/veya oksitlenmiş proteinlerin eliminasyonunun azalmasına neden olabilmektedir [47, 48].

Düzensiz proteostaz, yaşlanmanın ayırt edici özelliklerinden biridir. Hasarlı proteinler hücrel işlevleri bozabilmekte ve bu proteinlerin birikimleri dokuda işlev bozukluğuna dolayısıyla hastalıklara yol açabilmektedir. Bu nedenle hücre proteomunu korumak için; protein translayonu, katlanması ve bozulması aşamalarındaki düzenleyiciler gibi protein kalite kontrolünü sağlayan koruyucu mekanizmalar bulunmaktadır. Ökaryotik hücrelerde, protein yıkımı iki ana yolla gerçekleşmektedir. Bunlar: ubikuitin-proteazom sistemi (UPS) ve otofaji-lizozom yoludur [49]. Bu yollar hücre bölünmesi, hücre farklılaşması ve hücre ölümü gibi birçok hücrel ve fizyolojik süreçte rol almaktadırlar [50]. Proteazomlar hücre içi proteinlerin bozulmasında ve çok sayıda hücrel işlevde görev alan, lizozomal olmayan, katalitik proteinaz kompleksleridir. Oksidatif stresi indükleyen ajanların proteazomlara da zarar verebileceği gösterilmiştir. Hücre yaşlanması sırasındaki sürekli oksidatif stres, proteazom aktivitesini bozabilmektedir [48]. Yaşlanmaya bağlı olarak gelişen Parkinson hastalığında ise beyinde substantia nigra bölgesinde lizozomal ve otofagozomal füzyon kapasitesinin azaldığı görülmüştür [51].

### ***DNA Onarımında Bozulma***

DNA hasarı; beyin yaşlanması ve nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde rol almaktadır. Bununla birlikte, DNA onarımı mekanizmalarının yaşlanmayla birlikte değişimi tam olarak aydınlatılamamıştır. Histon Deasetilaz 1 (HDAC1) beyindeki DNA onarımını modüle eden enzimlerden biridir. HDAC1 eksikliği olan farelerde yaşa bağlı oluşan DNA hasarında birikim ve bilişsel bozulma görülmüştür [52]. Alzheimer hastalığı olan farelerde de HDAC1 aktivitesinde azalma gözlemlenmiştir. Ek olarak HDAC1'in farmakolojik aktivasyonunun beyin yaşlanması ve nörodejenerasyona karşı terapötik potansiyeli olduğu öne sürülmüştür [52]. Onarılmamış DNA hasarı, yaşlanan beyinde miyelin gen transkripsiyonunu ve oligodendrosit farklılaşmasını bozmaktadır [53]. Vegh ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada, yaşa bağlı bilişsel gerilemenin DNA hasarına ve bunun sonucu olarak spesifik sinaptik protein seviyelerinin değişimine bağlı olabileceği bulunmuştur [54]. Bilişsel gerileme, hem normal hem de patolojik beyin yaşlanmasının en erken belirtilerinden biridir.

### ***Nöroenezde Bozulma***

Normal yaşlanma sürecinde büyük bir nöron kaybı yoktur. Ancak dendritlerin sayısı, çapı, uzunluğu ve dallanmasının yanı sıra nöronlardaki dendritik dikenlerin yoğunluğu yaşlanma ile azalabilmektedir. Nöron ölümünün yoğunluğu ise beyin bölgesine göre farklılık göstermektedir. Nöron ölümünün nöroenez ile kısmen telafi edilebilmesi mümkündür fakat yaşla birlikte, nöroenez önemli ölçüde bozulmaktadır [55].

Nöroenez, öncüllerinden veya kök hücrelerden yeni nöronların oluşum sürecidir. Yeni nöronlar sadece beyin dokusunun yapısal bütünlüğünü ve yenilenmesini sağlamakla kalmaz, aynı zamanda öğrenme ve hafıza için de gereklidirler. Memelilerde nöroenez tüm yaşam boyunca devam etmekte, ancak yaşlandıkça bu süreç önemli ölçüde azalmaktadır [56]. Yetişkin beyninde nöroenezin azalması, hayati fizyolojik süreçlerin bozulmasına neden olmaktadır [57].



Nörogenezdeki yaşa bağlı bozulma birçok insan ve hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. Yaşlı sıçanlarda, yaşla birlikte olfaktör nörogenezde bir azalma olduğu bulunmuştur [58]. Hipokampal nörogenez seviyesindeki azalmanın, hafıza ve öğrenmedeki eksikliğin gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Uzamsal hafızaları sağlam sıçanlarda, hafıza bozukluğu olan sıçanlara kıyasla daha yüksek düzeyde hücre proliferasyonu ve daha yüksek sayıda yeni nöron oluşumu olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, yaşlı sıçanlarda hafıza bozukluğu nicel olarak hipokampal nörogenez ile ilişkilendirilmiştir [59]. Bu veriler, nörogenezin hafıza süreçlerinde ve yaşlılıkla ilgili bilişsel değişikliklerde rol oynadığı varsayımını güçlendirmektedir.

Diğer taraftan, immün homeostazın beyin yaşlanması sırasındaki nörogenez ve bilişsel gerileme üzerinde potansiyel bir etkisi vardır. Doğuştan gelen immün sistemin doğal öldürücü (natural killer, NK) hücrelerinin, insanlarda ve farelerde yaşlı beyinlerin dentat girus nörojenik nişinde bulunduğu bildirilmiştir [60]. Yaşlanan beyindeki NK hücre sürveyansı, nöroblastlar gibi beyinde yerleşik hücrelerin yaşlanmasıyla tetiklenmektedir. Yaşlı beyinde dentat girus bölgesi içindeki nöroblastlar; NK hücresi aktivitelerini güçlendirmektedirler. NK hücrelerinin sayısının azaltılması normal yaşlanma sırasındaki nörogenez ve bilişsel işlevlerde iyileşme sağlamaktadır. Sonuç olarak; yaşlanan beyindeki NK hücre birikiminin nörogenezi bozduğu görülmektedir [60].

## SONUÇ VE TARTIŞMA

Yaşın ilerlemesi sonucunda beynin işlevsel yetenekleri, öğrenme ve hafıza, dikkat, karar verme hızı, duyuşsal algı ve motor aktivitede düşüşler meydana gelmektedir. Yaşlanmaya bağlı olarak beyinde görülen yapısal ve işlevsel değişimler nörodejeneratif bozukluklarla birlikte Alzheimer, Parkinson gibi hastalıklara yatkınlık oluşturmaktadır. Yaşlanma teorilerine göre; yaşlanma genetik olarak programlanmış, yaşamsal faaliyetler sonucunda organizmanın zamanla zarar görmesiyle gelişen bir süreçtir. Yaşa bağlı işlev kayıpları hem organizmadaki hasarın zamanla birikmesinden hem de bakım ve onarım mekanizmalarındaki düşüştan kaynaklanmaktadır. Yaşlanan beyin moleküler seviyelerde incelendiğinde mitokondri işlev bozukluğu, oksidatif hasar görmüş moleküllerin hücre içi birikimi, hücrel atık imha mekanizmalarında bozulma, katlanmamış protein yanıtı gibi adaptif stres tepkilerinin bozulması, DNA tamiri ve nörogenez mekanizmalarında bozulmalar görülmektedir. Beyin yaşlanmasının moleküler düzeydeki mekanizmalarının aydınlatılmasının; yaşlanmaya bağlı oluşan bozukluklara karşı terapötik veya koruyucu yaklaşımlar geliştirilmesi açısından önemli olduğu görülmektedir.

## YAZAR KATKILARI

Kavram: E.Ö., S.H.; Tasarım: E.Ö., S.H.; Denetim: E.Ö., S.H.; Kaynaklar: - ; Malzemeler: - ; Veri Toplama ve/veya İşleme: - ; Analiz ve/veya Yorumlama: E.Ö., S.H.; Literatür Taraması: E.Ö., S.H.; Makalenin Yazılması: E.Ö., S.H.; Kritik İnceleme: E.Ö., S.H.; Diğer: -

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

## KAYNAKLAR

1. Mattson, M.P., Arumugam T.V. (2018). Hallmarks of brain aging: adaptive and pathological modification by metabolic states. *Cell Metabolism*, 27(6), 1176-1199. [[CrossRef](#)]
2. Levin, O., Fujiyama, H., Boisgontier, M.P., Swinnen, S.P., Summers, J.J. (2014). Aging and motor inhibition: a converging perspective provided by brain stimulation and imaging approaches. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 43, 100-117. [[CrossRef](#)]
3. Aarsland, D., Creese, B., Politis, M., Chaudhuri, K.R., Ffytche, D.H., Weintraub, D., Ballard, C. (2017). Cognitive decline in parkinson disease. *Nature Reviews Neurology*, 13(4), 217-231. [[CrossRef](#)]
4. Mattson, M.P. (2004). Pathways towards and away from alzheimer's disease. *Nature*, 430(7000), 631-639. [[CrossRef](#)]



5. Isaev, N.K., Stelmashook, E.V., Stelmashook, N.N., Sharonova, I.N., Skrebitsky, V.G. (2013). Brain aging and mitochondria-targeted plastoquinone antioxidants of SkQ-type. *Biochemistry (Mosc)*, 78(3), 295-300. [\[CrossRef\]](#)
6. Isaev, N.K., Stelmashook, E.V., Genrikhs, E.E. (2019). Neurogenesis and brain aging. *Reviews in the Neurosciences*, 30(6), 573-580. [\[CrossRef\]](#)
7. Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13, 757-772. [\[CrossRef\]](#)
8. Ionescu-Tucker, A., Cotman, C.W. (2021). Emerging roles of oxidative stress in brain aging and alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 107, 86-95. [\[CrossRef\]](#)
9. Butterfield, D.A., Howard, B.J., LaFontaine, M.A. (2001). Brain oxidative stress in animal models of accelerated aging and the age-related neurodegenerative disorders, alzheimer's disease and huntington's disease. *Current Medicinal Chemistry*, 8(7), 815-828. [\[CrossRef\]](#)
10. Zhang, Y., Ding, C., Cai, Y., Chen, X., Zhao, Y., Liu, X., Zhang, J., Sun, S., Liu, W. (2021). Astilbin ameliorates oxidative stress and apoptosis in D-galactose-induced senescence by regulating the PI3K/Akt/m-TOR signaling pathway in the brains of mice. *International Immunopharmacology*, 99, 108035. [\[CrossRef\]](#)
11. Aydın, A.F., Çoban, J., Doğan-Ekici, I., Betül-Kalaz, E., Doğru-Abbasoğlu, S., Uysal, M. (2016). Carnosine and taurine treatments diminished brain oxidative stress and apoptosis in D-galactose aging model. *Metabolic Brain Disease*, 31(2), 337-345. [\[CrossRef\]](#)
12. Singh, S., Singh, A.K., Garg, G., Rizvi, S.I. (2018). Fisetin as a caloric restriction mimetic protects rat brain against aging induced oxidative stress, apoptosis and neurodegeneration. *Life Sciences*, 193, 171-179. [\[CrossRef\]](#)
13. Garg, G., Singh, S., Singh, A.K., Rizvi, S.I. (2018). N-acetyl-l-cysteine attenuates oxidative damage and neurodegeneration in rat brain during aging. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 96(12), 1189-1196. [\[CrossRef\]](#)
14. Yang, C., DeMars, K.M., Candelario-Jalil, E. (2018). Age-dependent decrease in adropin is associated with reduced levels of endothelial nitric oxide synthase and increased oxidative stress in the rat brain. *Aging and Disease*, 9(2), 322-330. [\[CrossRef\]](#)
15. Li, X., Chen, Y., Shao, S., Tang, Q., Chen, W., Chen, Y., Xu, X. (2016). Oxidative stress induces the decline of brain EPO expression in aging rats. *Experimental Gerontology*, 83, 89-93. [\[CrossRef\]](#)
16. Navarro, A., Boveris, A. (2010). Brain mitochondrial dysfunction in aging, neurodegeneration, and parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2, 34. [\[CrossRef\]](#)
17. Leuner, K., Hauptmann, S., Abdel-Kader, R., Scherping, I., Keil, U., Strosznajder, J.B., Eckert, A., Müller, W. E. (2007). Mitochondrial dysfunction: the first domino in brain aging and alzheimer's disease? *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(10), 1659-1675. [\[CrossRef\]](#)
18. Boveris, A., Navarro, A. (2008). Brain mitochondrial dysfunction in aging. *IUBMB Life*, 60(5), 308-314. [\[CrossRef\]](#)
19. Li, Y., Yu, H., Chen, C., Li, S., Zhang, Z., Xu, H., Zhu, F., Liu, J., Spencer, P.S., Dai, Z., Yang, X. (2020). Proteomic profile of mouse brain aging contributions to mitochondrial dysfunction, DNA oxidative damage, loss of neurotrophic factor, and synaptic and ribosomal proteins. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 5408452. [\[CrossRef\]](#)
20. Klosinski, L.P., Yao, J., Yin, F., Fonteh, A.N., Harrington, M.G., Christensen, T.A., Trushina, E., Brinton, R.D. (2015). White matter lipids as a ketogenic fuel supply in aging female brain: implications for alzheimer's disease. *EbioMedicine*, 2(12), 1888-1904. [\[CrossRef\]](#)
21. Brown, M.K., Naidoo, N. (2012). The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases. *Frontiers in Physiology*, 3, 263. [\[CrossRef\]](#)
22. Oakes, S.A., Papa, F.R. (2015). The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annual Review of Pathology*, 10, 173-194. [\[CrossRef\]](#)
23. Wang, S., Kaufman, R. J. (2012). The impact of the unfolded protein response on human disease. *The Journal of Cell Biology*, 197(7), 857-867. [\[CrossRef\]](#)
24. Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology*, 2(6), 326-332. [\[CrossRef\]](#)
25. Ma, K., Vattem, K.M., Wek, R.C. (2002). Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18728-18735. [\[CrossRef\]](#)

26. Shen, J., Linda, X.C., Hendershot, L., Prywes, R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of golgi localization signals. *Developmental Cell*, 3(1), 99-111. [\[CrossRef\]](#)
27. Oakes, S.A. (2020). Endoplasmic reticulum stress signaling in cancer cells. *The American Journal of Pathology*, 190(5), 934-946. [\[CrossRef\]](#)
28. Taylor, R.C. (2016). Aging and the UPR(ER). *Brain Research*, 1648, 588-593. [\[CrossRef\]](#)
29. Oh, J.H., Nam, T.J. (2019). Hydrophilic glycoproteins of an edible green alga *capsosiphon fulvescens* prevent aging-induced spatial memory impairment by suppressing GSK-3 $\beta$ -Mediated ER stress in dorsal hippocampus. *Marine Drugs*, 17(3), 168. [\[CrossRef\]](#)
30. Naidoo, N, Ferber, M., Master, M., Zhu, Y., Pack, A.I. (2008). Aging impairs the unfolded protein response to sleep deprivation and leads to proapoptotic signaling. *The Journal of Neuroscience*, 28(26), 6539-6548. [\[CrossRef\]](#)
31. Hussain, S.G., Ramaiah, K.V. (2007). Reduced eIF2 $\alpha$  phosphorylation and increased proapoptotic proteins in aging. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 355, 365-370. [\[CrossRef\]](#)
32. Plaza-Zabala, A., Sierra-Torre, V., Sierra, A. (2017). Autophagy and microglia: novel partners in neurodegeneration and aging. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 598. [\[CrossRef\]](#)
33. Loeffler, D.A. (2019). Influence of normal aging on brain autophagy: a complex scenario. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11, 49. [\[CrossRef\]](#)
34. Liu, A.D., Guo, E.S., Yang, J.K., Yang, Y., Liu, S.P., Jiang, X.J., Hu, Q., Dirsch, O., Dahmen, U., Zhang, C.T., Gewirtz, D.A., Fang, H.S. (2018). Young plasma reverses age-dependent alterations in hepatic function through the restoration of autophagy. *Aging Cell*, 17(1), e12708. [\[CrossRef\]](#)
35. Cao Y., Klionsky D.J. (2007). Physiological functions of Atg6/Beclin 1: A unique autophagy-related protein. *Cell Research*, 17, 839-849. [\[CrossRef\]](#)
36. LaRocca, T.J., Henson, G D., Thorburn, A., Sindler, A.,L., Pierce, G. L., Seals, D.R. (2012). Translational Evidence That Impaired Autophagy Contributes To Arterial Ageing. *The Journal of Physiology*, 3005-3316. [\[CrossRef\]](#)
37. Shen, K., Liu, X., Chen, D., Chang, J., Zhang, Y., Kou, X. (2021). Voluntary wheel-running exercise attenuates brain aging of rats through activating miR-130a-mediated autophagy. *Brain Research Bulletin*, 172, 203-211. [\[CrossRef\]](#)
38. Cervellati, C., Trentini, A., Pecorelli, A., Valacchi, G. (2020). Inflammation in neurological disorders: the thin boundary between brain and periphery. *Antioxidants Redox Signaling*, 33(3), 191-210. [\[CrossRef\]](#)
39. Norden, D.M., Godbout J.P. (2013). Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 39, 19-34. [\[CrossRef\]](#)
40. Mosher K.I., Wyss-Coray T. (2014). Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology*, 88, 594-604. [\[CrossRef\]](#)
41. Marschallinger, J., Iram, T., Zardeneta, M., Lee, S.E., Lehallier, B., Haney, M.S., Pluvinage, J.V., Mathur, V., Hahn, O., Morgens, D.W., Kim, J., Tevini, J., Felder, T.K., Wolinski, H., Bertozzi, C.R., Bassik, M.C., Aigner, L., Wyss-Coray, T. (2020). Lipid-droplet-accumulating microglia represent a dysfunctional and proinflammatory state in the aging brain. *Nature Neuroscience*, 23(2), 194-208. [\[CrossRef\]](#)
42. Corlier, F., Hafzalla, G., Faskowitz, J., Kuller, L.H., Becker, J.T., Lopez, O.L., Thompson, P.M., Braskie, M.N. (2018). Systemic inflammation as a predictor of brain aging: Contributions of physical activity, metabolic risk, and genetic risk. *Neuroimage*, 172, 118-129. [\[CrossRef\]](#)
43. Sala-Llonch, R., Idland, A.V., Borza, T., Watne, L.O., Wyller, T.B., Brækhus, A., Zetterberg, H., Blennow, K., Walhovd, K.B., Fjell, A.M. (2017). Inflammation, amyloid, and atrophy in the aging brain: relationships with longitudinal changes in cognition. *Journal of Alzheimer's Disease*, 58(3), 829-840. [\[CrossRef\]](#)
44. Lindbergh, C.A., Casaletto, K.B., Staffaroni, A.M., Elahi, F., Walters, S.M., You, M., Neuhaus, J., Rivera Contreras, W., Wang, P., Karydas, A., Brown, J., Wolf, A., Rosen, H., Cobigo, Y., Kramer, J.H. (2020). Systemic tumor necrosis factor- $\alpha$  trajectories relate to brain health in typically aging older adults. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 75, 1558-1565. [\[CrossRef\]](#)
45. Spencer, S.J., D'Angelo, H., Soch, A., Watkins, L.R., Maier, S.F., Barrientos, R.M. (2017). High-fat diet and aging interact to produce neuroinflammation and impair hippocampal- and amygdalar-dependent memory. *Neurobiology of Aging*, 58, 88-101. [\[CrossRef\]](#)
46. Keller, J.N., Dimayuga, E., Chen, Q., Thorpe, J., Gee, J., Ding, Q. (2004). Autophagy, proteasomes, lipofuscin, and oxidative stress in the aging brain. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology*, 36(12), 2376-2391 [\[CrossRef\]](#)
47. Farout, L., Friguet, B. (2006). Proteasome function in aging and oxidative stress: implications in protein maintenance failure. *Antioxidants Redox Signaling*, 8(1-2), 205-216. [\[CrossRef\]](#)

48. Kukan, M. (2004). Emerging roles of proteasomes in ischemia-reperfusion injury of organs. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 55(1 Pt 1), 3-15.
49. Sun-Wang, J. L., Ivanova, S., Zorzano, A. (2020). The dialogue between the ubiquitin-proteasome system and autophagy: Implications in ageing. *Ageing Research Reviews*, 64, 101203. [\[CrossRef\]](#)
50. Eldeeb, M. A. (2021). N-Terminal-Dependent protein degradation and targeting cancer cells. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, 21(2), 231-236. [\[CrossRef\]](#)
51. Zucca, F.A., Vanna, R., Cupaioli, F.A., Bellei, C., Palma, A.D., Silvestre, D.D., Mauri, P., Grassi, S., Prinetti, A., Casella, L., Sulzer, D., Zecca, L. (2018). Neuromelanin organelles are specialized autolysosomes that accumulate undegraded proteins and lipids in aging human brain and are likely involved in Parkinson's disease. *NPJ Parkinson's Disease*, 4, 17. [\[CrossRef\]](#)
52. Pao, P.C., Patnaik, D., Watson, L.A., Gao, F., Pan, L., Wang, L., Adaikkan, C., Penney, J., Cam, H.P., Huang, W.C., Pantano, L., Lee, A., Nott, A., Phan, T.X., Gjoneska, E., Elmsaouri, S., Haggarty, S.J., Tsai, L.H. (2020). HDAC1 modulates OGG1-initiated oxidative DNA damage repair in the aging brain and Alzheimer's disease. *Nature Communications*, 11(1), 2484. [\[CrossRef\]](#)
53. Tse, K.H., Herrup, K. (2017). DNA damage in the oligodendrocyte lineage and its role in brain aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 161(Pt A), 37-50. [\[CrossRef\]](#)
54. Végh, M.J., Waard, M.C.D., Plujim, I.V.D., Ridwan, Y., Sassen, M.J.M., Nierop, P.V., Schors, R.C.V.D., Li, K.W., Hoeijlmakers, J.H.J., Smit, A.B., Kesteren, R.E.V. (2012). Synaptic proteome changes in a DNA repair deficient *ercc1* mouse model of accelerated aging. *Journal of Proteome Research*, 11(3), 1855-1867. [\[CrossRef\]](#)
55. Isaev, N.K., Stelmashook, E.V., Genrikhs, E.E. (2019). Neurogenesis and brain aging. *Reviews in the Neurosciences*, 30(6), 573-580. [\[CrossRef\]](#)
56. Ahlenius, H., Visan, V., Kokaia, M., Lindvall, O., Kokaia, Z. (2009). Neural stem and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiation into functional neurons despite lower number in aged brain. *Journal of Neuroscience*, 29(14), 4408-4419. [\[CrossRef\]](#)
57. Cameron, H.A., Glover, L.R. (2015). Adult neurogenesis: beyond learning and memory. *Annual Review of Psychology*, 66, 53-81. [\[CrossRef\]](#)
58. Enwere, E., Shingo, T., Gregg, C., Fujikawa, H., Ohta, S., Weiss, S. (2004). Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *The Journal of Neuroscience*, 24(38), 8354-8365. [\[CrossRef\]](#)
59. Drapeau, E., Mayo, W., Arousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P.V., Abrous, D.N. (2003). Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 14385-14390. [\[CrossRef\]](#)
60. Jin, W.N., Shi, K., He, W., Sun, J.H., Van Kaer, L., Shi, F.D., Liu, Q. (2021). Neuroblast senescence in the aged brain augments natural killer cell cytotoxicity leading to impaired neurogenesis and cognition. *Nature Neuroscience*, 24(1), 61-73. [\[CrossRef\]](#)



# KANSER TANISI VE TEDAVİSİNDE KULLANILAN MONOKLONAL ANTİKORLAR

## MONOCLONAL ANTIBODIES USED IN CANCER DIAGNOSIS AND TREATMENT

Merve BABAÇ<sup>1</sup> , Meliha EKİNCİ<sup>1\*</sup> , Derya İLEM-ÖZDEMİR<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Ege University, Faculty of Pharmacy, Department of Radiopharmacy, 35040, Izmir, Türkiye

### ÖZ

**Amaç:** Kanser, vücuttaki hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile gelişen bir hastalık olup anormal ve kontrolsüzce büyüyen hücreler ile karakterizedir. Kanser insidansı gün geçtikçe artarken, kanser tanı ve tedavisindeki yeni yaklaşımlar da büyük önem kazanmaktadır. Kanser tanısı amacıyla sıklıkla anatomik görüntüleme teknikleri ve nükleer görüntüleme sistemleri kullanılmaktadır. Kanser tedavisinde ise geleneksel yaklaşımların (cerrahi, radyoterapi, kemoterapi) yanı sıra son zamanlarda hedefe yönelik yaklaşımlar da kullanılmaktadır. Kanser tedavisindeki hedefe yönelik yaklaşımlar çoğunlukla küçük moleküllü tirozin kinaz inhibitörleri ve monoklonal antikoları içermektedir. Monoklonal antikolar ilk olarak antijenle immünize edilmiş farelerin B hücreleri ve miyelom kanser hücrelerinin oluşturduğu hibridomlardan elde edilmiştir. Çoğunlukla, biyolojik materyallerin tanısı, saflaştırılması ve analizlerinde, kanserin tanısı ve tedavisinde ve organ nakillerinde doku reddinin önlenmesinde kullanılmaktadır. Monoklonal antikoların eldesinin az zaman alması ve az maliyetli olması, monoklonal antikolara büyük avantaj sağlamaktadır. Bu avantajlarının yanında araştırmalar doğrultusunda farklı yan etkiler saptanmış olsa da hedefe spesifik oluşları ve diğer avantajlarından dolayı monoklonal antikolar günümüzde çokça rağbet görmektedir.

**Sonuç ve Tartışma:** Monoklonal antikolar ve beraberinde kanser tanı ve tedavisi araştırmaları günümüzde devam etmekle beraber bu konu tıp bilimi açısından önem taşıyan ve merak edilen bir konu olma özelliğini devam ettirmektedir. Bu derlemede kısaca kanser tanısı ve tedavisinde sıklıkla kullanılan monoklonal antikolar ve hedeflerinden, etki mekanizmalarından ve klinik kullanımlarından bahsedilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Kanser tanısı, kanser tedavisi, Monoklonal antikol

### ABSTRACT

**Objective:** Cancer is a disease that develops with the uncontrolled proliferation of cells in the body and is characterized by abnormal and uncontrolled growth of cells. While the incidence of cancer

\* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Meliha Ekinci  
e-posta / e-mail: melihaekinci90@gmail.com, Tel. / Phone: +902323113282

*is increasing day by day, new approaches in the diagnosis and treatment of cancer are gaining great importance. Anatomical imaging techniques and nuclear imaging systems are frequently used for cancer diagnosis. In the treatment of cancer, in addition to traditional approaches (surgery, radiotherapy, chemotherapy), targeted approaches have been used recently. Targeted approaches in cancer treatment mostly include small molecule tyrosine kinase inhibitors and monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies were initially obtained from hybridomas formed by B cells and myeloma cancer cells of antigen-immunized mice. It is mostly used in the diagnosis, purification and analysis of biological materials, diagnosis and treatment of cancer, and prevention of tissue rejection in organ transplants. Monoclonal antibodies have great advantages because they take less time to develop and cost less. In addition to these advantages, although different side effects have been detected in the direction of research, monoclonal antibodies are in great demand today due to their target specificity and other advantages.*

**Result and Discussion:** *Although research on monoclonal antibodies and cancer diagnosis and treatment continue today, this subject continues to be an important and curious subject in terms of medical science. In this review, monoclonal antibodies, which are frequently used in cancer diagnosis and treatment, and their targets, mechanisms of action and clinical uses will be discussed.*

**Keywords:** *Cancer diagnosis, cancer treatment, Monoclonal antibody*

## GİRİŞ

Monoklonal antikorlar kelime anlamı olarak; B hücresi tarafından üretilen spesifik bir antikor ile bir myeloma hücresi arasındaki birleşmeden oluşan hibrit hücre hatlarıdır. Monoklonal antikorlar, devamlı olarak antikor üreten "hibridom" adı verilen hücrelerden üretilmektedir. Monoklonal antikorların eldesi, sonsuz bölünme yeteneğine sahip tümör hücrelerini antikor üretebilen memeli hücreleriyle kaynaştırarak gerçekleştirilmektedir. Başka bir elde ediliş yolu da bağışıklanmış fare veya sıçanlardan elde edilen dalak hücreleri ile myeloma hücrelerinden geliştirilen melez hücreler tarafından gerçekleştirilir. Tek tip hibrid hücrelerden üretilmeleri sebebiyle "monoklonal hücreler" olarak adlandırılmaktadırlar [1]. Genellikle, biyolojik materyallerin tanısı, saflaştırılması ve analiz edilmesinde, kanser tanısı ve tedavisinde ve organ nakillerinde doku reddinin önlenmesinde kullanılmaktadır [1,2]. Monoklonal antikorların geleneksel tanı ve tedavilere göre avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Örneğin; kemoterapötiklere ve poliklonal antikorlara nazaran daha az toksiktir. 150 kDa büyüklüğünde olmaları, stabilite ve çözünürlüklerindeki problemler IgG formundaki bu antikorların tanı ve tedavideki kullanım potansiyellerini kısıtlayabilmektedir. Monoklonal antikor teknolojisi sayesinde yakın gelecekte daha kısa zamanda, daha spesifik ve daha yüksek afiniteye sahip antikorlar geliştirilebilecektir [3].

Bu derlemede, kısaca kanser tanısı ve tedavisinden bahsedilecek ve ardından monoklonal antikorlara, monoklonal antikorların hedeflerine, etki mekanizmalarına ve klinik kullanımlarına değinilecektir.

## Kanser

Kanser, vücuttaki hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile gelişen bir hastalıktır [4]. Anormal ve kontrolsüzce büyüyen hücreler, çevresel faktörlerden bağımsız olarak büyümeyi durdurma yeteneklerini kaybetmişlerdir [5]. Farklı isimlere sahip 100'den fazla farklı kanser türü vardır. Prostat kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, meme kanseri mide kanseri gibi buldukları organa ve hücre tipine göre isimleri değişmektedir. Artan kanser sıklığı ve tüm dünyada kansere bağlı ölüm oranlarının yüksek olması, kanserin önemini gün geçtikçe arttırmaktadır [4]. Kanser gelişim süreci hem genetik hem de çevresel faktörlerin etkisinden kaynaklanmaktadır. Kanser vakalarının yaklaşık %50'si, çoğunlukla çevresel etkenler (beslenme alışkanlıkları ve sosyal davranışlar) tarafından tetiklenebilir. Tümörlerin gelişim süreci çok yıllık ve çok aşamalıdır. Kanserinin ortaya çıkışı genellikle 20-30 yıl zararlı kanserojenlere maruz kalım sonucunda ortaya çıkmaktadır [6]. Yeni oluşan kanser hücrelerinin sayısı henüz az olduğunda, vücudun bağışıklık hücrelerinin onları teşhis edip yok edememesi kanserin oluşumunda kritik bir olaydır [5]. Kanser hücrelerinin büyümesi için oksijen ve besin gereksinimi vardır. Bu nedenle kanser hücreleri, sürekli oksijen ve besin kaynağı sağlamak amacıyla kan damarlarının oluşumunu uyarabilmekte ve normal dokuları istila edebilmektedir. Kronik stres, yaşlılık, kronik

zayıflatıcı hastalık, daha önce kemoterapi kullanımı, analjezik, antibiyotik, kortikosteroid gibi ilaçların kötüye kullanılması gibi faktörler bağışıklık sisteminin baskılanmasına neden olmakta ve bu baskılama da kanser riskini arttırabilmektedir [7].

### **Kanser Tanısı**

Kanser tanısı için sıklıkla anatomik görüntüleme teknikleri ve nükleer görüntüleme sistemleri kullanılmaktadır. Anatomik görüntüleme teknikleri arasında Bilgisayarlı Tomografi (BT), Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) ve ultrasonografi sayılabilir. Bu geleneksel görüntüleme sistemleri vücudun anatomisini ve yapısını göstermektedir. Nükleer tıp görüntüleme teknikleri [Tek Foton Emisyon Tomografisi (SPECT), Pozitron Emisyon Tomografisi (PET), Gama Kameralar] ise incelenen dokunun veya organın fizyolojik durumunu göstermektedir [8].

Göğüs veya karın boşluğunu görüntülemek için bir BT veya MRG taraması kullanılabilirken; kalp, beyin ya da akciğerler gibi belirli organları görüntülemek için nükleer görüntüleme teknikleri kullanılmaktadır. Kullanılan ajan spesifik hücrese reseptörleri veya fonksiyonları hedefliyorsa, tüm vücut PET taraması veya PET/BT taraması gibi tüm vücuda dayalı olarak nükleer tıp çalışmaları yapılmaktadır [5].

Anatomik görüntüleme tekniklerinde kanser 1 cm<sup>3</sup> çapa veya 1 milyon hücreye ulaştığı anda tespit edilebilirken, nükleer görüntüleme sistemlerinde ise kanserde henüz anatomik değişikliklerin oluşmadığı, fizyolojik düzeyde değişiklikler olduğu anda kanser tespit edilebilmektedir. Bu görüntüleme sistemlerinde radyofarmasötikler kullanılmaktadır. Radyofarmasötikler; farmasötik ve radyonüklidik (radyoaktif) olarak iki kısımdan oluşmaktadır. Görüntüleme amacıyla genellikle gama ( $\gamma$ ) ya da pozitron ( $\beta^+$ ) yayan radyoizotoplarla hazırlanan radyofarmasötikler kullanılırken, tedavi amacıyla çoğunlukla beta ( $\beta^-$ ) veya alfa ( $\alpha$ ) yayan radyoizotoplarla hazırlanan radyofarmasötikler kullanılmaktadır [8].

Çoğu kanser, kromozom yapısındaki ve sayısındaki değişikliklerle karakterize olup anormal bir kromozom içeriğine sahiptir. Bazıları erken evrelerde tespit edilebilmektedir [9]. Geleneksel karyotipleme, metafazlarda ya da interfaz çekirdeklerinde floresan *in situ* hibridizasyon ve mikrodizi teknolojisi gibi teknikler kanser tespiti için kullanılmaktadır [10]. Bu tekniklerin tanıda kullanılmasının yanında her kanser türü için farklı belirteçler de bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak, her kanser türüne özgü gen mutasyonları, kromozomal sapmalar, epigenomik değişiklikler, mikroRNA profil değişiklikleri, aile öyküleri, bazı virüslerin varlığı sayılabilir.

### **Kanser Tanısında Hedefe Yönelik Yaklaşımlar**

Monoklonal antikolar, PET veya gama kamera sintigrafisi için çok uygun olan spesifik radyonüklidler kullanılarak işaretlenmektedirler. Monoklonal antikoların radyonüklidlerin seçici olarak hedeflenmesinde taşıyıcı olarak görev yapmaları, Ehrlich'in "sihirli mermi" kavramı çerçevesinde malign hastalıkların teşhis ve tedavisinde önemli bir yer almaktadır. Radyoışaretili monoklonal antikoların kullanımları ile, görüş alanında tüm vücudu içeren tek bir tanısall görüntüleme taraması ile spesifik biyobelirteçlerin tespitine ve tümör heterojenliğinin *in vivo* olarak değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Ayrıca, aynı monoklonal antikor daha sonra bir radyoimmünoterapi (RIT) yaklaşımının bir parçası olarak  $\beta$  veya  $\alpha$  parçacıklarının vücuda verilebilmesi için benzer bir radyonüklid ile radyoışaretlenebilmektedir [3]. Hibridoma türevli monoklonal antikoların ortaya çıkmasıyla reaktiflerin kanser tespiti ve tedavisindeki *in vivo* kullanımları yoğunlaşmıştır. Monoklonal antikor teknolojisi hala geliştirilme aşamasında olmasına rağmen, rekombinant antijen ve antikor mühendisliği tekniklerinin hazırlanmasındaki son gelişmeler, bu teknolojinin kanser teşhisindeki uygulamalarını önemli ölçüde artırmıştır. Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında, monoklonal antikor tabanlı testler, hastalığın teşhisi için uzaysal, zamansal, doğru ve nicel ölçüm sağlayabilmektedir.

Monoklonal antikoların sadece kanser teşhisinde değil aynı zamanda çeşitli hastalıklarının teşhisinde (örneğin; bakteri, virüs, protozoa, ...) patojenlerin tanımlanması ve antijenik karakterizasyon için de önem arz etmektedir. Bunların yanında metabolik ve hormonal bozuklukların teşhisinde terapötik ve hedefe yönelik ilaç dağıtım sistemleri alanında uygulamaları da mevcuttur.

### **Kanser Tedavisi**

Kanserin tedavi şansı, yeterince erken fark edildiğinde henüz boyut olarak küçük olma eğiliminde

olduğundan dolayı yüksektir. Erken teşhis ile kanserin cerrahi olarak çıkarılması daha kolay olup radyoterapi veya kemoterapi tedavileriyle de küçülme olasılığı bulunmaktadır. Kanser hücrelerinin büyümesi dört durum gerçekleşmediği takdirde devam eder. Bunlar;

- i. Kanserli kitlenin cerrahi olarak çıkarılması;
- ii. Kemoterapi veya hormon tedavisi gibi kansere özgü başka bir ilaç türünün kullanılması;
- iii. Radyasyon tedavisi;
- iv. Kanser hücrelerinin küçülmesi ve kendi kendine kaybolmasıdır (nadiren bazı melanomlarda veya böbrek kanserlerinde) [5].

### Kanser Tedavisinde Geleneksel Yaklaşımlar

Kanser tedavisinde cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi olarak genelde üç yaklaşım kullanılmaktadır [5]:

- i. **Cerrahi:** Cerrahi tedaviye birçok yaygın katı tümör için tek iyileştirici tedavi olarak başvurulmaktadır. Uzak metastaz bulunmaması ve lokal infiltrasyon olmaması durumunda başarılı bir cerrahi tedavi sağlanabilmektedir.
- ii. **Radyoterapi:** Radyoterapi, lokal bir yöntem olarak kanser tedavisinde yer almaktadır.
- iii. **Kemoterapi:** Sitotoksik ajanların ağız veya damar yoluyla (genellikle kombinasyonlar halinde) uygulanmasına kemoterapi denir ve bu tedavi kanser hücrelerinin çoğalmasını, istilasını, metastaz yapmasını ve hastada ölümcül sonuçlara neden olmasını önlemek amacıyla hastaya uygulanır. Yaygın malign hastalıklar için sistemik kemoterapi ana tedavi seçeneğidir.

### Kanser Tedavisinde Hedefe Yönelik Yaklaşımlar

Hedefe yönelik yaklaşımlar, kanser hücrelerindeki tek moleküler veya bir sınıf moleküler hedefli tedavilerdir. Geleneksel tedaviler yüzlerce genin ekspresyonunun değişimine neden olduğu için hedefli yaklaşımlara ihtiyaç doğmuştur. Hedefe yönelik tedavide spesifik etki mekanizmaları ile terapötik indeks arttırılmıştır. Bu tedaviler iki başlık altında incelebilmektedir [7,11]:

- i. Küçük molekülü tirozin kinaz inhibitörleri
- ii. Monoklonal antikorlar

Kanser tedavisinde sağkalımı arttırmak için immün tahribattan kaçınmak gerekmektedir. Bu nedenle immünoterapi, kanser hastalarının tedavi yanıtlarında ve hayatta kalma sürelerinde iyileşmeyi sağlamaktadır. İmmünoterapötik stratejilerin (*ex vivo* aktive edilmiş T hücreleri, immünomodülatör monoklonal antikorlar ve kanser aşalarının adaptif transferi) moleküler patolojide, hedeflerin belirlenmesinde ve tümörlerin alt tiplere ayrılmasında kullanılması ile tedaviye yanıt tahmin edilerek prognostik bilgi sağlanabilmektedir [11].

Meme kanseri (kadınlar arasında görülen en yüksek deri dışı kanser olup 1/8 oranında teşhis edilmektedir), cilt kanseri (melanom dışı), kolon kanseri, prostat kanseri, testis kanseri, serviks kanserleri ve çocukluk çağı malignitelerinin birçoğunun erken teşhisi ile tedavisi diğer kanser türlerinin tedavisine göre daha umut verici ve başarılıdır. Örneğin; serviks kanserinin lezyonlar pre-kanserözken teşhis edilmesiyle sağkalım %100'e yakınken, evre III'te teşhis edilmesiyle bu oran %32'ye ve Evre IV'te teşhis edilmesiyle ise oran %16'ya düşmektedir [12,13].

Multipl Miyelom tedavisi sadece semptomatik miyelomu olan hastalara uygulanmaktadır. Kök hücre nakli için uygun olmayan hastalarda ise anti-miyelom ajan kombinasyonları (melfalan-prednizon, lenalidomid-melfalan-prednizon gibi) kullanılmaktadır. Allojenik transplantasyonunda tedaviye bağlı yüksek mortalite nedeniyle doz-yoğunluğu azaltılmış allojenik transplantasyon birçok hastanın tedavisi için umut vaat etmektedir [14].

Cerrahi rezeksiyon, gastrik kanserin tedavisinde önemli bir yere sahiptir. Tümörün çoğunlukla kemoterapiye duyarlı olduğu zaman cerrahi için en uygun zamandır [15]. Rezeksiyondan sonra kemoterapinin devamı oldukça önemlidir [16]. Diğer bir tedavi ise adjuvan kemoterapidir ve bu tedavi tek başına cerrahiye kıyasla gastrik kanser hastalarının ölüm oranını önemli ölçüde azalttığını göstermiştir [17]. Radyasyon tedavisi, tümör hücrelerini yok etmek için yüksek enerjili ışınlar veya parçacıklar şeklinde uygulanır. Vakaların çoğunda radyasyon tedavisi kemoterapi (kemoradyasyon) ile verilir. Hem neo-adjuvan kemoradyoterapi tedavisi hem de neo-adjuvan kemoterapi benzer bir etkinlikle rezektabl gastrik kanserli hastaların klinik sonuçlarını önemli ölçüde iyileştirmektedir [18]. Gastrik



kanserlerde hedefe yönelik tedavi amacıyla monoklonal antikolar kullanılmaktadır. Örneğin; mide tümörünün moleküler özelliklerine dayanan başlıca terapötik seçenekler Ranibizumab ve Trastuzumab'dır [6].

Kanser tedavisinde araştırmacıların çalışmaları;

- i. Erken teşhis amacıyla yaygın kanserler için uygun maliyetli tarama yöntemleri,
- ii. Yeni ve daha etkili cerrahi teknikler,
- iii. Yeni ve daha etkili radyoterapi,
- iv. Yeni ve daha etkili kemoterapi ilaçları,
- v. Monoklonal antikolar,
- vi. Kanser aşılı,
- vii. Gen tedavileri geliştirmeyi hedeflemektedir.

### Monoklonal Antikolar

Monoklonal antikolar, çeşitli kanser türleri de dahil olmak üzere birçok hastalığın tanısı ve tedavisi için kullanılmaktadır. Bir monoklonal antikor tasarımı için öncelikle doğru antijeninin tanımlanması gerekmektedir.

Monoklonal antikor tedavisi, antikora bağlı sitotoksik yolun aktivasyonu ve kompleman aracılı sitotoksikite yoluyla konakçı savunma mekanizmalarını kullanmaktadır. Ayrıca apoptotik sinyalleme ve büyümeyi önleyici yolaklar ile hareket etmektedir. Radyonüklidler veya toksinler ile monoklonal antikor tedavisinin konjugasyonu terapötik yaklaşımlar sunmaktadır [1].

Bağışıklık sisteminde insan antikoları gibi davranan monoklonal antikolar insan yapımı proteinlerdir. Dört farklı yol ile üretilir ve buna göre de isimlendirilirler [1,2]:

- **Mürin:** Mürin proteinler, fare proteinlerinden yapılır ve tedavilerin adları “-omab” ile biter.
- **Kimerik:** Kimerik proteinler, kısmen fare ve kısmen insandan oluşan bir kombinasyondur ve tedavilerin adları “-simab” ile biter.
- **İnsanlaştırılmış:** İnsanlaştırılmış proteinler, insan proteinlerine bağlı fare proteinlerinin küçük parçalarından yapılır ve tedavilerin adları “-zumab” ile biter.
- **İnsansı:** Bu grup tamamen insan proteinleridir ve tedavilerin adları “-umab” ile biter.

Tipik bir antikor-ilaç konjugatı, tümör hücresine özgü antijenlerin yüzeyine bağlanabilen bir monoklonal antikordan oluşmaktadır. Bunlar, bağışıklık sisteminin B ve T hücrelerinin yüzeyindeki proteinleri de içerecek şekilde tasarlanabilmektedir. Bu spesifik antikor, parçalanabilir bir bağlayıcı aracılığıyla sitotoksik bir ilaca bağlanır. İlaç, geri dönüşü olmayan DNA hasarına neden olarak veya hücre bölünmesine müdahale ederek tümör hücresi ölümünü indükler. Antikor-ilaç konjugatlarının etki mekanizması, antikorun spesifik bir antijeni tanıma ve ona bağlanma yeteneğidir. Bu bağlanma, hücrenin lizozomal enzimlerinin tümör hücrelerini öldürmek için sitotoksik ilacı saldırdığı endositoz adı verilen süreç aracılığıyla bir dizi olayı (Aşama 1-5) başlatır [19].

Programlanmış Hücre Ölümü Proteini 1 (PD-1), Programlanmış Ölüm Ligandı 1 (PD-L1) ve PD-L2'yi bağlayabilmektedir. PD-L1'in PD-1'e bağlanması, lenf düğümlerinde antijene özgü T hücrelerinin proliferasyonunu azaltan bir inhibitör sinyal iletir. PD-L1 hedefli monoklonal antikolar, farklı kanserlerin tedavisi için Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Bununla birlikte, kanser hastalarının sadece bir kısmı, kanser hücrelerinde yüksek PD-L1 ekspresyonuna bağlı olması nedeniyle antikor tedavisine yanıt vermektedir. PD-L1 ekspresyonu, çeşitli tümör hücrelerinde eksprese edilen immün kontrol noktalarını hedefleyen tedaviler için değerli bir biyobelirteçtir [20]. Bununla birlikte, PD-L1 normal dokular ve hücreler üzerinde de eksprese edildiğinden hem etkinliği hem de güvenliği güvence altına almak için tümör hedefli dağıtım sistemlerine ihtiyaç vardır.

### Monoklonal Antikoların Üretim Yöntemleri

Belirli bir antikorun birçok kopyası laboratuvarında yapılabilmektedir. Bunlar monoklonal antikolar olarak bilinir. Üretim yöntemlerinin temeli, antijenin fareye verilmesi sonucu oluşan antikolara, sonsuz bölünme yeteneği kazandırarak, kültür ortamında istenilen antikoları üretecek hibrid hücreler geliştirmektir [3].

1. İlk olarak antijen fareye enjekte edilir ve sonra, farenin dalağında antikor üreten B lenfositleri



toplanır.

2. Elde edilen B lenfosit hücreleri, sonsuz üreme özelliğine sahip hücrelerle kaynaştırılır.
3. Bu kaynaştırma sonucu, kültür ortamında “hibridom” adı verilen hücreler elde edilir. Bu aşamada kaynaşamayan hücreler ölür.
4. Hibridomlar ayrı ayrı kültür ortamına alınır ve burada bölünerek çoğaltılır.
5. Orijinal antijene bağlanma kabiliyetine sahip antikoru üreten bir hibridoma kültürü seçilir.
6. Seçilen hibridomlar, laboratuvar koşulları altında veya farenin gövdesi içinde yayılır.
7. Son olarak antikolar saflaştırılır.

Ancak bu özel hibridomlar, insan bağışıklık sistemi tarafından "yabancı" (antijen) olarak algılanan fare kaynaklı antikoların oluşumuna neden olmaktadır. İnsan anti-fare antikoları nedeniyle bu antikolarla verilen antikolar, bağışıklık sistemi tarafından etkisiz hale getirilir. Ayrıca vücutta birçok komplikasyona neden olan insan anti-murin antikoları (HAMA) yanıtına da neden olmaktadır. Bu nedenle hem HAMA yanıtının oluşturulmasını hem de fare antikolarının etkisizleştirilmesini önlemek için fare monoklonal antikolarını hümanize etmek veya tamamen insan benzeri monoklonal antikolar geliştirmek önemlidir. Kimerik antikolar, insanlaştırılmış antikolar ve tamamen insansı antikolar, ilaç üreticileri tarafından bağışıklık tepkisini azaltmak için çeşitli tekniklerle geliştirilmiştir [21].

1975'te Ulusal Kanser Enstitüsü'nde araştırmacı César Milstein ve Georges Köhler terapötik bir tedavi olarak monoklonal antikoların gelişimini başlatmışlar ve hibridomaların oluşumunu tarif ederek monoklonal antikoru üretmişlerdir [1]. 1984'te ise bu çalışma için Milstein ve Köhler, Niels Jerne ile Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü'nü almıştır [22]. İlk monoklonal antikolar ile tedavi 1980'de gerçekleşmiş olup devamında Ron Levy öncülüğünde Stanford Üniversitesi'ndeki bir grup tarafından lenfoma hastalarını tedavi etmek amacıyla monoklonal anti-idiotip antikolar üretimi için öncü çalışmalar yapılmıştır [2,23]. Bu çalışmalar, monoklonal antikoların dramatik bir antitümör etkisi olduğunu ve güvenli oldukları kanıtlanmasına rağmen ticarileşme ve hastaya özel olmaları nedeniyle sınırlanmıştır. Birtakım çalışmalar ve keşifler sonucunda tümörleri tanımlanan antijenleri eksprese eden hastalarda kullanılacak terapötik monoklonal antikoların üretiminin yolu açılmıştır [3].

## Monoklonal Antikor Türleri

### Çıplak Monoklonal Antikolar

Çıplak monoklonal antikolar, kendi başlarına çalışan, kendilerine bağlı herhangi bir radyoaktif madde ya da ilaç içermeyen antikolarlardır. Kanser tedavisinde kullanılan en yaygın monoklonal antikoru türüdür. Çoğu çıplak monoklonal antikolar, kanser hücreleri yüzeyindeki antijenlere bağlanarak çalışsa da bazıları da kanserli olmayan diğer hücre yüzeyindeki antijenlere ve hatta serbest yüzen proteinlere bağlanarak da çalışır [11].

### Konjuge Monoklonal Antikolar

Konjuge monoklonal antikolar, bir radyoaktif partikül ya da bir kemoterapi ilacı ile birleştirilerek kullanılmaktadır. Bu monoklonal antikolar, radyoizotop ya da ilaçtan birini doğrudan kanser hücrelerine almak için bir hedefleme aracı olarak kullanılır. Monoklonal antikoru, hedef antijeni bulup bağlanana kadar vücutta dolaşır. Böylece vücudun diğer bölgelerindeki normal hücrelere verilen hasar azaltılır [11,24].

### Radyoışaretli Antikolar

Radyoışaretli antikoların kendilerine bağlı küçük radyoaktif partikülleri bulunmaktadır. Ibritumomab tiuxetan, radyoışaretli bir monoklonal antikoru örneğidir. Ibritumomab tiuxetan, B hücrelerinde bulunan CD20 antijenine karşı bir monoklonal antikordur. Ibritumomab tiuxetan, radyoaktiviteyi doğrudan kanser hücrelerine iletir. Hem bir monoklonal antikordan (rituksimab) hem de bir radyoaktif maddeden (Yttrium-90) oluşmaktadır. Bu tip antikolarla tedaviler radyoimmünoterapi olarak adlandırılır [25].

### Kemoışaretli Antikolar

Bu monoklonal antikoların kendilerine bağlı güçlü kemoterapi (veya diğer) ilaçları

bulunmaktadır [24]. Örnek olarak;

- Brentuximab vedotin, CD30 antijenini hedefleyen ve MMAE adlı bir kemo ilacına bağlanan bir antikordur.
- Ado-trastuzumab emtansin, HER2 proteinini hedefleyen ve DM1 adlı bir kemo ilacına bağlanan bir antikordur.

### Bispesifik Monoklonal Antikorlar

Bispesifik monoklonal antikorlar, 2 farklı monoklonal antikorun parçalarından oluşarak aynı anda 2 farklı proteine bağlanabilme özelliğine sahiptirler. Örnek olarak, bazı lösemi türlerini tedavi etmek için kullanılan blinatumomab verilebilir. Blinatumomab'ın bir kısmı, lösemi ve lenfoma hücrelerinde bulunan CD19 proteinine bağlanır. Başka bir kısmı ise, T hücreleri adı verilen bağışıklık hücrelerinde bulunan bir protein olan CD3'e bağlanır. Bu monoklonal antikor, bu proteinlerin her ikisine de bağlanarak kanser hücrelerini ve bağışıklık hücrelerini bir araya getirir ve bunun da bağışıklık sisteminin kanser hücrelerine saldırmasına neden olduğu düşünülmektedir [11].

Kanser tanı ve tedavisinde sıklıkla kullanılan monoklonal antikorların antikor tipi, hedefi, etki mekanizması ve klinik kullanımları **Tablo 1**'de özetlenmiştir.

**Tablo 1.** Kanser tanısında ve tedavisinde sıklıkla kullanılan monoklonal antikorlar

Monoklonal antikor	Antikor tipi	Hedef	Etki mekanizması	Klinik kullanımı
Ritüksimab [22,26-32]	Kimerik insan/fare antikoru	CD20	CD20 antijenine yüksek afinite ve özgüllük ile bağlanır. CD20+ hücrelerinin ritüksimab tarafından elimine edilmesinde en az dört mekanik yol sorumludur. (1) Ritüksimabın B hücresi yüzeyinde CD20'ye bağlanması, doğrudan B'yi indükleyebilen membran saldırı kompleksini (MAC) oluşturan kompleman kaskadı aktivasyonuna neden olur ve tamamlayıcıya bağlı sitotoksosite (CDC) ile hücre lizisi olur. (2) Ritüksimabın bağlanması, Fc reseptörleri (FcR'ler) III yoluyla doğal öldürücü hücrelerle etkileşime izin verir ve böylece antikora bağlı hücrel sitotoksositeye (ADCC) yol açar. (3) Ritüksimabın Fc kısmı ve biriken kompleman fragmanları hem FcR'ler hem de makrofağlar üzerindeki kompleman reseptörleri tarafından tanınarak, fagositoza ve ADCC'ye yol açar. Böylelikle ADCC'nin merkezinde yer alan hücrel bağışıklık tepkilerinin başlangıcı tetiklenir. (4) Lipid molekülünde birkaç ritüksimab ve CD20 molekülünün çapraz bağlanması, bu komplekslerin doğrudan apoptoza aracılık eden Src kinazları içeren bir sinyal yolunun elemanları ile etkileşimini belirler. Ayrıca B lenfositlerinde CD20'ye bağlanan ritüksimabın, çoklu CD20 moleküllerinin çapraz bağlanmasını tetikleyerek klasik olmayan apoptoz yoluyla hücre ölümünü indüklediği düşünülmektedir.	B hücreli lenfoma, multipl skleroz
İbritumomab [21,24,33,34]	Mürin IgG1	CD20	B hücrelerinde bulunan CD20 yüzey molekülünü hedefler. Anti-CD20 monoklonal antikorları, hücre döngüsünün düzenlenmesi üzerinde bir etkiye sahiptir ve bir dizi başka potansiyel mekanizmanın yanı sıra apoptozun indüklenmesine yol açan çok çeşitli sinyal olaylarını indükler.	B hücreli lenfoma, düşük dereceli veya foliküler B hücreli Hodgkin Dışı Lenfoma

**Tablo 1 (devamı).** Kanser tanısında ve tedavisinde sıklıkla kullanılan monoklonal antikolar

Tositumomab [25,35]	Mürin IgG2a ( <sup>131</sup> I işaretli)	CD20	Çoklu etki mekanizmalarını içermektedir: (1) apoptoz, (2) CDC, (3) ADCC ve (4) radyoizotoptan iyonlaştırıcı radyasyon. Ayrıca bu etki mekanizmalarının haricinde ilk tedavide hayatta kalan hücrelere karşı adaptif bağışıklığa yol açan potansiyel bir aşı benzeri etkinin olduğu da düşünülmektedir.	B hücreli lenfoma
Ofatumumab [36-38]	İnsan IgG1	CD20	CD20 proteininin iki yeni epitopuna bağlanır. Antikor tarafından bağlandıktan sonra, CD20 molekülü hücre yüzeyinden hücre içine alınmaz. Hedef epitoplari bağlandıktan sonra dolaşımdaki B hücrelerinde antikora bağlı hücre lizisine neden olur. ADCC'den daha fazla CDC'ye neden olsa da hücre lizisinin mekanizmaları Ocrelizumab'a benzerdir.	Kronik lenfosittik lösemi, ikincil progresif multiple skleroz, romatoid artrit, hematolojik maligniteler
Alemtuzumab [39,40]	İnsanlaştırılmış IgG1kappa	CD52	Doğuştan gelen bağışıklık hücrelerini etkilemeden CD52 eksprese eden T ve B lenfositlerini tüketir. İlk tükenmeden sonra, B hücreleri 6 ayda başlangıç seviyelerine yeniden ulaşırken, T hücre sayıları 12. ayda bile başlangıç seviyelerine ulaşamaz. Toplam lenfosit sayıları 12 ay sonra hastaların %80'inde başlangıç seviyelerine geri döner. Alemtuzumab tedavisinden sonra düzenleyici T hücre oranı artar ve yavaş yavaş başlangıç düzeyine döner, ancak 12. ayda yüksek kalır.	B hücreli kronik lenfosittik lösemi, aktif relapsing-remitting multiple skleroz
Bevacizumab [41]	Rekombinant insanlaştırılmış IgG	VEGF	VEGF'nin etkisini inhibe ederek, mevcut tümör damarlanmasının gerilemesine neden olduğu ve yeni kan damarlarının gelişmesini engellediği ve böylece tümör büyümesini engellediği düşünülmektedir.	Kolon, akciğer, meme, renal kanserler, glioblastoma, serviks, tekrarlayan epitelyal yumurtalık, fallop tüpü veya primer peritoneal tümörleri
Ranibizumab [42-45]	İnsanlaştırılmış IgG1	VEGF-A	VEGFR-1 ve VEGFR-2 reseptörlerinin aktivasyonunu bloke etmek için VEGF-A'ya bağlanır, böylece reseptör aktivasyonu nedeniyle neovaskülarizasyonu önlenir. Tedavi sistemik VEGF supresyonu ile ilişkili değildir. Ranibizumabın farmakokinetiği, normalde tam boyutlu antikolarda bulunan kristalize edilebilir fragman bölgesinin yokluğundan etkilenir. Bu durum, ranibizumabın vitreustan sistemik dolaşıma penetrasyonunun azalmasına ve sistemik dolaşımdan hızlı eliminasyonuna katkıda bulunur.	Diyabetik maküler ödem, miyop koroid neovaskülarizasyonu, prematüre retinopatisi
Abciximab [46-48]	Kimerik insan- mürin antikoru	GP IIb/IIIa reseptörü	Fab fragmanının sabit bölgesi insanlaştırılmıştır, değişken bölge ise trombosit GPIIb/IIIa reseptörüne yüksek afiniteli bağlanmayı sağlar. Abciximab, trombositler ve megakaryositler üzerinde bulunan GPIIb/IIIa reseptörlerini bloke eder. Abciximabın trombosit GPIIb/IIIa reseptörüne bağlanması, fibrinojen, von Willebrand faktörü ve diğer protein moleküllerinin GPIIb/IIIa reseptörü ile etkileşimini engelleyerek trombosit agregasyonu ve tromboz ile etkileşime girer. Diğer GPIIb/IIIa reseptör-antagonistlerinden farklı olarak, abciximab, önemi tam olarak anlaşılmamış olan vitronektin reseptörüne de bağlanır.	Antitrombotik miyokard enfarktüsü

**Tablo 1 (devamı).** Kanser tanısında ve tedavisinde sıklıkla kullanılan monoklonal antikörler

Denosumab [49-51]	İnsan IgG2	RANKL	RANKL, kemik erimesi için osteoklastları aktive eder ve meme bezi ve sekonder lenf nodu organogenezini sağlar. RANKL ayrıca derin bağışıklık düzenleyici etkilere sahiptir, çünkü reseptöre bağlanma, düzenleyici T hücrelerini ve çoklu sinyal iletim yollarının aktivasyonu yoluyla kemorezistanlığı indükler. Nükleer faktör kappa-B ligandının reseptör aktivatörünün osteoklastlar üzerindeki RANK'a bağlanmasını önler ve böylece kemik emilimini baskılar. RANKL inhibisyonu, bağışıklık tepkilerini artırır ve kanseri tedavi etmek için bir immünoterapötik ajan olarak umut vaat eder.	Meme ve prostat kanseri (kansere bağlı kemik kaybı tedavisi)
İpilimumab [52,53]	İnsan IgG1	CTLA-4	CTLA-4 ve PD-1, adaptif bağışıklığın düzenlenmesinde tamamlayıcı rol oynuyor gibi görüldüğünden tedavide İpilimumab ve	Melanoma
Nivolumab [52-54]	İnsan IgG4	PD-1	Nivolumab kombine olarak kullanılmaktadır. PD-1, periferik dokularda T-hücresinin baskılanmasına katkıda bulunur gibi görünse de CTLA-4, T-hücresi aktivasyonunu daha erken noktalarında inhibe eder. Klinik öncesi modellerde, PD-1 ve CTLA-4'ün koordineli blokajı, her iki yolun tek başına bloke edilmesinden daha belirgin antitümör aktivite sağlar.	Melanom, renal hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
Cetuximab [55,56]	İnsanlaştırılmış IgG1	EGFR	EGFR-ligand etkileşimini bloke eder ve akış aşağı RAS-ERK aktivasyonunu inhibe eder. RAS'taki bazı aktive edici mutasyonlar cetuximabın etkinliğini etkiler. Cetuximabın, güçlü bir antitümör tepkisini aktive eden immünojenik hücre ölümünü (ICD) indüklediği varsayılmaktadır. Cetuximabın kemoterapi ile kombinasyon halinde kullanımı, endoplazmik retikulum stres yanıtını ve dendritik hücreler tarafından fagositozdaki artışı yaratarak ICD'nin desteklenmesini sağlar. ICD indüksiyonu, EGFR sinyal yolunun mutasyonel durumuna ve X-box bağlayıcı protein 1'in (XBP1) eklenmesinin inhibisyonuna bağlıdır.	Kolon, akciğer kanseri, baş ve boyun kanseri, metastatik kolorektal, pankreas kanseri
Panitumumab [57,58]	İnsan IgG2	EGFR	Panitumumab EGFR'yi işgal eder ve böylece EGF ve diğer büyüme faktörlerinin bağlanmasını önler. Saf bir antagonist olup EGFR'nin içselleştirilmesini indükler. GFR'nin aktivasyonunu ve sinyal transdüksiyonu kaskadını inhibe ederek büyüme faktörlerinin ekspresyonunun azalmasına neden olur. EGFR'nin aktivasyonu (dimerizasyon, otofosforilasyon ve sinyal iletimi) tarafından tetiklenen hücre içi süreçler panitumumab tarafından önlenir ve sonuçta artan apoptoza, tümör hücrelerinin proliferasyonunun azalmasına ve anjiyogenezin azalmasına yol açar. Sonuç olarak tümör büyümesi ve metastaz gelişimi engellenir.	Kolon kanseri
Trastuzumab [19,59]	İnsanlaştırılmış IgG1	HER2	Trastuzumab tümör hücrelerinde HER2'ye bağlanır ve ardından lizozomal enzimler tarafından hücre içine alınır. Daha sonra çekirdeğe girer ve DNA hasarına ve apoptotik hücre ölümüne neden olur.	Meme kanseri, HER2 pozitif mide kanseri, HER2 pozitif kolorektal kanser ve HER2 pozitif küçük hücreli dışı akciğer kanseri

**Tablo 1 (devamı).** Kanser tanısında ve tedavisinde sıklıkla kullanılan monoklonal antikorlar

Pertuzumab [60,61]	İnsanlaştırılmış IgG1	HER2	Pertuzumab, HER2'nin diğer HER reseptörleri ile heterodimerizasyonu için gerekli olan ve aşağı akım sinyal yollarının aktivasyonuna yol açan HER2 proteininin hücre dışı alanı II'ye bağlanır. HER2'nin diğer HER reseptörleri ile heterodimerizasyonunu inhibe eder. Pertuzumabın potansiyeli, trastuzumab ile uygulandığında HER2/3 ekseninin ikili tam blokajına dayanır.	Metastatik meme kanseri, erken meme kanseri
Atezolizumab [20,62]	Hümanize IgG1 monoklonal antikor	PD-L1	Bir T hücresi, hedef hücre üzerindeki majör histokompatibilite kompleksi tarafından eksprese edilen antijeni tanıdığı anda, inflamatuvar süreci başlatan inflamatuvar sitokinler üretilir. Bu sitokinler dokuda PD-L1 ekspresyonu ile sonuçlanır. Bazı tümörlerde, özellikle melanomlarda, bu koruyucu mekanizma, PD-L1'in aşırı ekspresyonu yoluyla bozulur; sonuç olarak, tümöre karşı bir bağışıklık tepkisinin oluşmasını engeller. PD-1/PD-L1 inhibitörleri, PD-1/PD-L1 etkileşimini farmakolojik olarak önler, böylece tümörü öldürmek için pozitif bir bağışıklık tepkisini kolaylaştırır. T hücrelerini baskılarlar ve düzenleyici T hücrelerinin üretimini artırırlar, böylece oto-bağışıklığı azaltır ve toleransı geliştirirler.	İleri ürotelyal karsinom, metastatik küçük hücreli dışı akciğer kanseri
Ublituximab [32,63]	Kimerik glikofare/insan antikor	CD20	Ublituximab, CD20 antijeni üzerinde rituksimab, ofatumumab ve obinutuzumab'dan farklı benzersiz bir epitopi hedefler. Gelişmiş ADCC'ye izin verir. Bunun için düşük fukoz içeren, parça kristalleşebilir bir bölgeye sahip olacak şekilde gliko-mühendislik ile geliştirilmiştir.	Richter transformasyonu, diffüz büyük B hücreli lenfoma, mantle hücreli lenfoma, foliküler lenfoma, marjinal zon lenfoma
Ocrelizumab [32,64]	Hümanize IgG1 monoklonal antikor (fareden)	CD20	CD20'nin hücre dışı döngüsüne bağlanarak dolaşımdaki B hücrelerinde antikora bağlı hücre lizisine neden olur. Apoptotik B hücresi tükenmesinin mekanizmaları; antikora bağlı hücre aracılı fagositoz, ADCC ve CDC'dir. Başka bir etki mekanizması olarak düşünülen mekanizma; multiple skleroz hastalarında mevcut olduğu gösterilen CD20+ T hücrelerini hedeflemesidir.	Multipl skleroz, Multipl sklerozun B hücre hedefli tedavisi
Obinutuzumab [65]	Tip II gliko-mühendislikli hümanize IgG monoklonal antikor (fareden)	CD20	Hem doğru ritoksitotoksik etki hem de ADCC etki gösterir. Rituksimab gibi etki gösterir. Yapılan çalışmalara göre; Obinutuzumab bazlı immünokemoterapi ve idame tedavisi, rituksimab bazlı tedaviye göre daha uzun progresyonsuz sağkalım ile sonuçlanmıştır ve Obinutuzumab bazlı kemoterapi ile yüksek dereceli yan etkiler daha yaygındır.	Kronik lenfositik lösemi, Hodgkin dışı lenfoma, diffüz büyük B hücreli lenfoma

\*MAC: Membran Saldırı Kompleksi, CDC: Komplemana Bağlı Sitotoksiste, ADCC: Antikora Bağlı Hücrel Sitotoksiste, FcR: Fc reseptörü, ICD: İmmünojenik Hücre Ölümü, XBP1: X-Box Bağlayıcı Protein 1.

Yapılan çalışmalar EGFR'nin birçok kanser türünde mutasyona uğradığını veya normalden fazla eksprese edildiğini göstermektedir [55-58]. Bu sebeple, monoklonal antikorlar kanser tedavisi ve tanısı açısından büyük öneme sahiptir. Monoklonal antikorların tanıda kullanımları genellikle araştırma aşamasında olup klinik kullanımları kısıtlıdır. Monoklonal antikorlar biyomedikal ve mikrobiyolojik araştırmalarda kullanılan önemli teşhis reaktifleri olarak kullanılmaktadırlar.

Onkoloji alanında kullanılan ilk terapötik monoklonal antikor intravenöz olarak uygulanan Rituksimab olup subkutan formülasyonu da SABRINA ve SAWYER klinik deneylerinin sonuçlarına dayalı olarak uygulamayı basitleştirmek, uygulama süresini kısaltmak ve tedavi yükünü azaltarak hasta uyuncunu iyileştirmek için geliştirilmiştir [66].

Ağırlıklı olarak son 20 yılda, spesifik monoklonal antikorlarla tümör hedefleme çalışmaları yürütülmektedir. Kolorektal kanser tedavisinde kullanılan Cetuximab, antianjiyogenik tedavide kullanılan Panitumumab ve Trastuzumab gibi monoklonal antikorlar; Imatinib, Erlotinib, Sorafenib, Sunitinib gibi küçük molekülü tirozin kinaz inhibitörleri FDA tarafından onaylanmıştır ve klinikte kullanılmaktadır [7,11,55,58].

### Monoklonal Antikorların Olası Yan Etkileri

Monoklonal antikorlar damar içine enjekte edilir. Antikorlar protein yapılı olduğu için bazen alerjik reaksiyona neden olabilmektedir. Monoklonal antikorların olası yan etkileri arasında ateş, titreme, zayıflık, baş ağrısı, mide bulantısı, kusma, ishal, düşük kan basıncı ve döküntüler sayılabilir [26,28].

Bazı monoklonal antikorlar, hedefledikleri antijenlerle ilgili yan etkilere sahip olabilir. Örneğin:

- Bevacizumab, tümör kan damarı büyümesini etkileyen VEGF adı verilen bir proteini hedefleyen bir monoklonal antikordur. Yüksek tansiyon, kanama, kötü yara iyileşmesi, kan pıhtıları ve böbrek hasarı gibi yan etkilere neden olabilir [41].
- Cetuximab, normal cilt hücrelerinde (ve bazı kanser hücrelerinde) bulunan EGFR adlı bir hücre proteinini hedef alan bir monoklonal antikordur. Bazı insanlarda ciddi döküntülere neden olabilir [55,56].
- Rituksimab, B hücre yüzeyinde bulunan CD20 antijenini hedefleyen bir monoklonal antikordur. Sitokin aracılı reaksiyonlara (kızarma, düşük kan basıncı vb.) ve hipotansiyona neden olabilir [22].
- Tositumomab, B hücre yüzeyinde bulunan CD20 antijenini hedefleyen bir monoklonal antikor olup gözlenen en ciddi advers reaksiyonları; şiddetli ve uzun süreli sitopeniler ve trombositopenili hastalarda enfeksiyonlar (sepsis), kanama, alerjik reaksiyonlar (bronkospazm ve anjiyoödem), sekonder lösemi ve miyelodisplaziyi içeren sitopeni sekelleridir. Daha az görülen ancak ciddi advers reaksiyonlar ise pnömoni, plevral efüzyon ve dehidratasyondur [67].
- Ocrelizumab, B hücre yüzeyinde bulunan CD20 antijenini hedefleyen bir monoklonal antikordur. Klinik olarak en önemli advers olaylar, immünosupresyona ikincil enfeksiyonlardır. Hipogamaglobulinemi de görülebilmektedir. Nazofarenjit, üst solunum yolu, herpes zoster alevlenmeleri ve idrar yolu enfeksiyonları en sık gözlenen enfeksiyonlardandır [68].
- Ofatumumab, CD20 proteininin epitoplarnı hedefleyen bir monoklonal antikor olup enfeksiyon, nötropeni, infüzyonla ilişkili reaksiyon, anemi, trombositopeni, öksürük ve pnömoni gibi yan etkileri bulunur. Ciddi advers etkisi sitokin salıverme sendromu vakası ile çoğunlukla infüzyon reaksiyonlarıdır. Daha az yaygınlıkta ise kolelitiazis, hipokalemi, anjiyoödem ve ürtiker meydana gelebilir [69].
- İbritumomab, CD20 antijenini hedefleyen bir monoklonal antikor olup HAMA titresi yüksek hastalarda aşırı duyarlılık reaksiyonlarının gelişmesine neden olabilir [70].
- Alemtuzumab, CD52 proteinini hedefleyen bir monoklonal antikor olup otoantikor oluşumuna yol açarak tiroid bozuklukları, immün trombositopenik purpura, nefropatiler, sitopeniler ve otoimmün hepatit gibi otoimmün bozuklukların riskini artırabilir [71]. Hastaların %3,1'inde ciddi IAR (tedaviyle ilişkisinden bağımsız olarak herhangi bir infüzyon sırasında veya 24 saat içinde meydana gelen AE'ler) meydana gelmiştir ve bunlar arasında kalp rahatsızlıkları (göğüs rahatsızlığı, hipotansiyon, taşikardi ve atriyal fibrilasyon), ateş, baş ağrısı, mide bulantısı ve ürtiker bulunmaktadır [72].
- Ranibizumab, VEGF-A proteinini hedefleyen bir monoklonal antikordur. Diğer anti-VEGF ajanlarda olduğu gibi, sistemik VEGF'nin inhibisyonu nedeniyle ranibizumab ile oküler olmayan kanama ve arteriyel tromboembolik olaylar meydana gelebilir [42-45].
- Abciximab, trombositler ve megakaryositler üzerinde bulunan GP IIb/IIIa reseptörlerini hedefleyen bir monoklonal antikordur. Yapılan klinik çalışmalarda hastaların %2,5 - %6'sında trombositopeni (trombosit sayısı  $\leq 100.000 \mu\text{L}$ ) meydana gelirken, hastaların %0,4 ila %1,6'sında ise ciddi trombositopeni (trombosit sayısı  $\leq 50.000 \mu\text{L}$ ) meydana gelmiştir [73].
- CTLA-4'ü hedefleyen İpilimumab ve PD-1'i hedefleyen monoklonal antikorlar kombine olarak

kullanıldığında yapılan çalışmalarda pnömoni, hipotiroidizm, hipofizit, tiroidit, adrenal yetmezlik, hipertiroidizm, tiroid fonksiyon testinde anormallikler, aspartat aminotransferaz artışı, alanin aminotransferaz artışı, ishal, kolit, kan kreatinin artışı, akut böbrek yetmezliği, tubulointerstisyel nefrit, döküntü, kaşıntı, ürtiker, ciltte kabarcık ve infüzyon reaksiyonları gözlenmiştir [53].

- Panitumumab, EGFR proteinini hedef alan bir monoklonal antikordur. En yaygın yan etkileri; EGFR'nin blokajı yoluyla birincil etki şekli ile ilgili olan göz, cilt ve gastrointestinal problemlerdir. Diğer bir yaygın problem ise Panitumumab'ın böbrekte filtre edilmiş magnezyumun tübüler geri emilimi ve gastrointestinal sistemdeki magnezyum emilimi üzerindeki etkileri ile açıklanan hipomagnezemidir [57].

Anti-CD20 monoklonal antikoları ile bildirilen en yaygın yan etkiler infüzyon reaksiyonlarıdır [74]. Bu ajanlar intravenöz olarak uygulandığında, difenhidramin gibi bir antihistaminik ve asetaminofen gibi ateş düşürücü ilaçlarla premedikasyon gibi yerleşik güvenlik protokollerini uygulamak önemlidir. Ciddi advers etki riskini azaltmak için glukokortikoidlerle önleyici dozlama da düşünülebilir [75].

## SONUÇ VE TARTIŞMA

20. yüzyılın en korkulan hastalıklarından biri olan kanser, 21. yüzyılda süreklilik ve artan insidansla daha da yayılmaktadır. Her dört kişiden biri yaşam boyu kanser riski taşımakta ve dünya çapında her yıl 14 milyonun üzerinde yeni kanser vakası kaydedilmektedir. Bu nedenle kanserin erken evrede gerek tanısı gerekse tedavisi oldukça önem taşımaktadır. Monoklonal antikolar geleneksel tanı ve tedavi yöntemlerinde kullanılan kimyasal ajanlara (örneğin; kemoterapötikler) kıyasla antijene spesifik olma özellikleri sayesinde daha az toksik olup hem kanserin teşhisinde hem de tedavisinde gözde bir yaklaşım olarak yer almaktadırlar. Fakat her ne kadar efektif olsalar da monoklonal antikoların da yan etkileri halen günümüzde araştırılmakla birlikte sonuçlar ortaya konmaktadır. Yeni araştırmalar, denemeler ve yeni tedavi yaklaşımları ile monoklonal antikolar ile kanser tanı ve tedavisinin her geçen gün geliştirileceğinden ve bilimsel çalışmalardan her birinin bu yolda ışık tutacağından şüphemiz yoktur.

## YAZAR KATKILARI

Kavram: M.E.; Tasarım: M.E.; Denetim: M.E., D.İ.Ö.; Kaynaklar: M.B., M.E., D.İ.Ö.; Malzemeler: M.B., M.E., D.İ.Ö.; Veri Toplama ve/veya İşleme: M.B., M.E.; Analiz ve/veya Yorumlama: M.B., M.E., D.İ.Ö.; Literatür Taraması: M.B., M.E.; Makalenin Yazılması: M.B., M.E.; Kritik İnceleme: M.E., D.İ.Ö.; Other: -

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

## KAYNAKLAR

1. Köhler, G., Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497. [\[CrossRef\]](#)
2. Liu, J.K.H. (2012). The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations. *Annals of Medicine and Surgery*, 3(4), 113-116. [\[CrossRef\]](#)
3. Lim, S.H., Beers, S.A., French, R.R., Johnson, P.W., Glennie, M.J., Cragg, M.S. (2010). Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives. *Haematologica*, 95(1), 135-143. [\[CrossRef\]](#)
4. Ozdemir, A., Kaplan Serin, E., Savas, M. (2018). Cancer risk factors and prevention in Turkey. *International Journal of Health Services Research and Policy*, 3(3), 143-150. [\[CrossRef\]](#)
5. Roy, P.S., Saikia, B.J. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian Journal of Cancer*, 53(3), 441-442. [\[CrossRef\]](#)



6. Machlowska, J., Baj, J., Sitarz, M., Maciejewski, R., Sitarz, R. (2020). Gastric cancer: Epidemiology, risk factors, classification, genomic characteristics and treatment strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 4012. [\[CrossRef\]](#)
7. Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. [\[CrossRef\]](#)
8. Ekinci, M., İlem Özdemir, D. (2021). Radyofarmasötikler ve teranostikler [Radiopharmaceuticals and theranostics]. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi*, 10(1), 119-132. [\[CrossRef\]](#)
9. Jurczyszyn, A., Charliński, G., Suska, A., Vesole, D.H. (2021). The importance of cytogenetic and molecular aberrations in multiple myeloma. *Acta Haematologica Polonica*, 52(4), 361-370. [\[CrossRef\]](#)
10. Fonseca, R., Barlogie, B., Bataille, R., Bastard, C., Bergsagel, P.L., Chesi, M., Davies, F.E., Drach, J., Greipp, P.R., Kirsch, I.R., Kuehl, W.M., Hernandez, J.M., Minvielle, S., Pilarski, L.M., Shaughnessy, J.D., Jr, Stewart, A.K., Avet-Loiseau, H. (2004). Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Research*, 64(4), 1546-1558. [\[CrossRef\]](#)
11. Couzin-Frankel, J. (2013). Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6165), 1432-1433. [\[CrossRef\]](#)
12. Reeves, G.K., Beral, V., Green, J., Gathani, T., Bull, D., Million Women Study Collaborators (2006). Hormonal therapy for menopause and breast-cancer risk by histological type: a cohort study and meta-analysis. *The Lancet. Oncology*, 7(11), 910-918. [\[CrossRef\]](#)
13. Cuzick, J., DeCensi, A., Arun, B., Brown, P.H., Castiglione, M., Dunn, B., Forbes, J.F., Glaus, A., Howell, A., von Minckwitz, G., Vogel, V., Zwierzina, H. (2011). Preventive therapy for breast cancer: a consensus statement. *The Lancet. Oncology*, 12(5), 496-503. [\[CrossRef\]](#)
14. Caers, J., Vande broek, I., De Raeve, H., Michaux, L., Trullemans, F., Schots, R., Van Camp, B., Vanderkerken, K. (2008). Multiple myeloma-an update on diagnosis and treatment. *European Journal of Haematology*, 81(5), 329-343. [\[CrossRef\]](#)
15. Swan, R., Miner, T.J. (2006). Current role of surgical therapy in gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 12(3), 372-379. [\[CrossRef\]](#)
16. Santoro, R., Ettore, G.M., Santoro, E. (2014). Subtotal gastrectomy for gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 20(38), 13667-13680. [\[CrossRef\]](#)
17. GASTRIC (Global Advanced/Adjuvant Stomach Tumor Research International Collaboration) Group, Paoletti, X., Oba, K., Burzykowski, T., Michiels, S., Ohashi, Y., Pignon, J.P., Rougier, P., Sakamoto, J., Sargent, D., Sasako, M., Van Cutsem, E., Buyse, M. (2010). Benefit of adjuvant chemotherapy for resectable gastric cancer: a meta-analysis. *JAMA*, 303(17), 1729-1737. [\[CrossRef\]](#)
18. Tsai, C., Mueller, A., Maubach, J., Warschkow, R., Nussbaum, D.P., Schmied, B.M., Blazer, D., Gloor, B., Worni, M. (2020). No difference in survival between neo-adjuvant chemotherapy and neo-adjuvant chemoradiation therapy in gastric cardia cancer patients: A contemporary view from the national cancer database. *Digestive Surgery*, 37(3), 249-257. [\[CrossRef\]](#)
19. Bang, Y.J., Van Cutsem, E., Feyereislova, A., Chung, H.C., Shen, L., Sawaki, A., Lordick, F., Ohtsu, A., Omuro, Y., Satoh, T., Aprile, G., Kulikov, E., Hill, J., Lehle, M., Rüschoff, J., Kang, Y. K., ToGA Trial Investigators (2010). Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*, 376(9742), 687-697. [\[CrossRef\]](#)
20. Lee, H.T., Lee, J.Y., Lim, H., Lee, S.H., Moon, Y.J., Pyo, H.J., Ryu, S.E., Shin, W., Heo, Y.S. (2017). Molecular mechanism of PD-1/PD-L1 blockade via anti-PD-L1 antibodies atezolizumab and durvalumab. *Scientific Reports*, 7(1), 5532. [\[CrossRef\]](#)
21. Tjandra, J.J., Ramadi, L., McKenzie, I.F. (1990). Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients. *Immunology and Cell Biology*, 68(Pt 6), 367-376. [\[CrossRef\]](#)
22. Salles, G., Barrett, M., Foà, R., Maurer, J., O'Brien, S., Valente, N., Wenger, M., Maloney, D.G. (2017). Rituximab in B-cell hematologic malignancies: A review of 20 years of clinical experience. *Advances in Therapy*, 34(10), 2232-2273. [\[CrossRef\]](#)
23. Miller, R.A., Maloney, D.G., Warnke, R., Levy, R. (1982). Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotype antibody. *The New England Journal of Medicine*, 306(9), 517-522. [\[CrossRef\]](#)
24. Pohlman, B., Sweetenham, J., Macklis, R.M. (2006). Review of clinical radioimmunotherapy. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 6(3), 445-461. [\[CrossRef\]](#)
25. Davies, A.J. (2005). A review of tositumomab and I(131) tositumomab radioimmunotherapy for the treatment of follicular lymphoma. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 5(4), 577-588. [\[CrossRef\]](#)
26. Jaglowski, S.M., Alinari, L., Lapalombella, R., Muthusamy, N., Byrd, J.C. (2010). The clinical application of monoclonal antibodies in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 116(19), 3705-3714. [\[CrossRef\]](#)

27. Weiner, G.J. (2010). Rituximab: mechanism of action. *Seminars in Hematology*, 47(2), 115-123. [\[CrossRef\]](#)
28. Abulayha, A., Bredan, A., El Enshasy, H., Daniels, I. (2014). Rituximab: modes of action, remaining dispute and future perspective. *Future Oncology (London, England)*, 10(15), 2481-2492. [\[CrossRef\]](#)
29. Bowles, J.A., Wang, S.Y., Link, B.K., Allan, B., Beuerlein, G., Campbell, M.A., Marquis, D., Ondek, B., Wooldridge, J.E., Smith, B.J., Breitmeyer, J.B., Weiner, G.J. (2006). Anti-CD20 monoclonal antibody with enhanced affinity for CD16 activates NK cells at lower concentrations and more effectively than rituximab. *Blood*, 108(8), 2648-2654. [\[CrossRef\]](#)
30. Maloney, D.G., Smith, B., Rose, A. (2002). Rituximab: mechanism of action and resistance. *Seminars in Oncology*, 29(1 Suppl 2), 2-9.
31. Grandjean, C.L., Garcia, Z., Lemaître, F., Bréart, B., Bousso, P. (2021). Imaging the mechanisms of anti-CD20 therapy in vivo uncovers spatiotemporal bottlenecks in antibody-dependent phagocytosis. *Science Advances*, 7(8), eabd6167. [\[CrossRef\]](#)
32. Lehmann-Horn, K., Kinzel, S., Weber, M.S. (2017). Deciphering the role of B cells in multiple sclerosis-towards specific targeting of pathogenic function. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2048. [\[CrossRef\]](#)
33. Mukherjee, S., Ayanambakkam, A., Ibrahim, S., Schmidt, S., Charkrabarty, J.H., Khawandanah, M. (2018). Ibritumomab tiuxetan (Zevalin) and elevated serum human anti-murine antibody (HAMA). *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*, 11(3), 187-188. [\[CrossRef\]](#)
34. Jacobs, S.A. (2007). Yttrium ibritumomab tiuxetan in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: current status and future prospects. *Biologics: Targets & Therapy*, 1(3), 215-227.
35. Davies, A.J., Rohatiner, A.Z., Howell, S., Britton, K.E., Owens, S.E., Micallef, I.N., Deakin, D. P., Carrington, B.M., Lawrance, J.A., Vinnicombe, S., Mather, S.J., Clayton, J., Foley, R., Jan, H., Kroll, S., Harris, M., Amess, J., Norton, A.J., Lister, T.A., Radford, J.A. (2004). Tositumomab and iodine I 131 tositumomab for recurrent indolent and transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(8), 1469-1479. [\[CrossRef\]](#)
36. Sellebjerg, F., Blinkenberg, M., Sorensen, P.S. (2020). Anti-CD20 monoclonal antibodies for relapsing and progressive multiple sclerosis. *CNS Drugs*, 34(3), 269-280. [\[CrossRef\]](#)
37. Østergaard, M., Baslund, B., Rigby, W., Rojkovich, B., Jorgensen, C., Dawes, P.T., Wiell, C., Wallace, D.J., Tamer, S.C., Kastberg, H., Petersen, J., Sierakowski, S. (2010). Ofatumumab, a human anti-CD20 monoclonal antibody, for treatment of rheumatoid arthritis with an inadequate response to one or more disease-modifying antirheumatic drugs: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase I/II study. *Arthritis and Rheumatism*, 62(8), 2227-2238. [\[CrossRef\]](#)
38. Reagan, J.L., Castillo, J.J. (2011). Ofatumumab for newly diagnosed and relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 11(2), 151-160. [\[CrossRef\]](#)
39. Freedman, M.S., Kaplan, J.M., Markovic-Plese, S. (2013). Insights into the mechanisms of the therapeutic efficacy of alemtuzumab in multiple sclerosis. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 4(4), 1000152.
40. Syed, Y.Y. (2021). Alemtuzumab: A review in relapsing remitting multiple sclerosis. *Drugs*, 81(1), 157-168. [\[CrossRef\]](#)
41. Rosen, L.S., Jacobs, I.A., Burkes, R.L. (2017). Bevacizumab in colorectal cancer: Current role in treatment and the potential of biosimilars. *Targeted Oncology*, 12(5), 599-610. [\[CrossRef\]](#)
42. Ng, D., Fung, N., Yip, F., Lai, T. (2020). Ranibizumab for myopic choroidal neovascularization. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 20(12), 1385-1393. [\[CrossRef\]](#)
43. Lee, A., Shirley, M. (2021). Ranibizumab: A review in retinopathy of prematurity. *Paediatric Drugs*, 23(1), 111-117. [\[CrossRef\]](#)
44. Stahl, A., Lepore, D., Fielder, A., Fleck, B., Reynolds, J.D., Chiang, M.F., Li, J., Liew, M., Maier, R., Zhu, Q., Marlow, N. (2019). Ranibizumab versus laser therapy for the treatment of very low birthweight infants with retinopathy of prematurity (RAINBOW): an open-label randomised controlled trial. *The Lancet*, 394(10208), 1551-1559. [\[CrossRef\]](#)
45. Fogli, S., Del Re, M., Rofi, E., Posarelli, C., Figus, M., Danesi, R. (2018). Clinical pharmacology of intravitreal anti-VEGF drugs. *Eye (London, England)*, 32(6), 1010-1020. [\[CrossRef\]](#)
46. Neumann, F.J., Kastrati, A., Schmitt, C., Blasini, R., Hadamitzky, M., Mehilli, J., Gawaz, M., Schleaf, M., Seyfarth, M., Dirschinger, J., Schömig, A. (2000). Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade with abciximab on clinical and angiographic restenosis rate after the placement of coronary stents following acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 35(4), 915-921. [\[CrossRef\]](#)
47. Collier, B.S. (1995). The role of platelets in arterial thrombosis and the rationale for blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as antithrombotic therapy. *European Heart Journal*, 16 Suppl L, 11-15. [\[CrossRef\]](#)

48. Usta, C., Turgut, N.T., Bedel, A. (2016). How abciximab might be clinically useful. *International Journal of Cardiology*, 222, 1074-1078. [\[CrossRef\]](#)
49. Dell'Aquila, E., Armento, G., Iuliani, M., Simonetti, S., D'Onofrio, L., Zeppola, T., Madaudo, C., Russano, M., Citarella, F., Ribelli, G., Pantano, F., Vincenzi, B., Tonini, G., Santini, D. (2020). Denosumab for cancer-related bone loss. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 20(11), 1261-1274. [\[CrossRef\]](#)
50. Peters, S., Clézardin, P., Márquez-Rodas, I., Niepel, D., Gedye, C. (2019). The RANK-RANKL axis: an opportunity for drug repurposing in cancer? *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 21(8), 977-991. [\[CrossRef\]](#)
51. Peters, S., Danson, S., Hasan, B., Dafni, U., Reinmuth, N., Majem, M., Tournoy, K.G., Mark, M.T., Pless, M., Cobo, M., Rodriguez-Abreu, D., Falchero, L., Moran, T., Ortega Granados, A.L., Monnet, I., Mohorcic, K., Sureda, B.M., Betticher, D., Demedts, I., Macias, J.A., Cuffe, S., Luciani, A., Sanchez, J.G., Curioni-Fontecedro, A., Gautschi, O., Price, G., Coate, L., von Moos, R., Zielinski, C., Provencio, M., Menis, J., Ruepp, B., Pochesci, A., Roschitzki-Voser, H., Besse, B., Rabaglio, M., O'Brien, M.E.R., Stahel, R.A. (2020). A Randomized Open-Label Phase III Trial Evaluating the Addition of Denosumab to Standard First-Line Treatment in Advanced NSCLC: The European Thoracic Oncology Platform (ETOP) and European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) SPLENDOUR Trial. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 15(10), 1647-1656. [\[CrossRef\]](#)
52. Wolchok, J.D., Kluger, H., Callahan, M.K., Postow, M.A., Rizvi, N.A., Lesokhin, A.M., Segal, N.H., Ariyan, C.E., Gordon, R.A., Reed, K., Burke, M.M., Caldwell, A., Kronenberg, S.A., Agunwamba, B.U., Zhang, X., Lowy, I., Inzunza, H.D., Feely, W., Horak, C.E., Hong, Q., Korman, A.J., Wigginton, J.M., Gupta, A., Sznol, M. (2013). Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 369(2), 122-133. [\[CrossRef\]](#)
53. Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., O'Day, S., Weber, J., Garbe, C., Lebbe, C., Baurain, J. F., Testori, A., Grob, J.J., Davidson, N., Richards, J., Maio, M., Hauschild, A., Miller, W.H., Jr, Gascon, P., Lotem, M., Harmankaya, K., Ibrahim, R., Francis, S., Chen, T.T., Humphrey, R., Hoos, A., Wolchok, J.D. (2011). Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 364(26), 2517-2526. [\[CrossRef\]](#)
54. Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., Leming, P.D., Spigel, D.R., Antonia, S.J., Horn, L., Drake, C.G., Pardoll, D.M., Chen, L., Sharfman, W.H., Anders, R.A., Taube, J. M., McMiller, T.L., Xu, H., Korman, A.J., Jure-Kunkel, M., Agrawal, S., McDonald, D., Kollia, G.D., Gupta, A., Wigginton, J.M., Sznol, M. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *The New England Journal of Medicine*, 366(26), 2443-2454. [\[CrossRef\]](#)
55. Wong, S.F. (2005). Cetuximab: an epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer. *Clinical Therapeutics*, 27(6), 684-694. [\[CrossRef\]](#)
56. Pozzi, C., Cuomo, A., Spadoni, I., Magni, E., Silvola, A., Conte, A., Sigismund, S., Ravenda, P. S., Bonaldi, T., Zampino, M.G., Cancelliere, C., Di Fiore, P.P., Bardelli, A., Penna, G., Rescigno, M. (2016). The EGFR-specific antibody cetuximab combined with chemotherapy triggers immunogenic cell death. *Nature Medicine*, 22(6), 624-631. [\[CrossRef\]](#)
57. Dubois, E.A., Cohen, A.F. (2009). Panitumumab. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 68(4), 482-483. [\[CrossRef\]](#)
58. Saltz, L., Easley, C., Kirkpatrick, P. (2006). Fresh from the pipeline: panitumumab. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 987-988. [\[CrossRef\]](#)
59. Ogitani, Y., Aida, T., Hagihara, K., Yamaguchi, J., Ishii, C., Harada, N., Soma, M., Okamoto, H., Oitate, M., Arakawa, S., Hirai, T., Atsumi, R., Nakada, T., Hayakawa, I., Abe, Y., Agatsuma, T. (2016). DS-8201a, a novel HER2-targeting ADC with a novel DNA topoisomerase I inhibitor, demonstrates a promising antitumor efficacy with differentiation from T-DM1. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 22(20), 5097-5108. [\[CrossRef\]](#)
60. Richard, S., Selle, F., Lotz, J.P., Khalil, A., Gligorov, J., Soares, D.G. (2016). Pertuzumab and trastuzumab: the rationale way to synergy. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 88 Suppl 1, 565-577. [\[CrossRef\]](#)
61. Robert, M., Frenel, J.S., Bourbouloux, E., Berton Rigaud, D., Patsouris, A., Augereau, P., Gourmelon, C., Campone, M. (2020). Pertuzumab for the treatment of breast cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 20(2), 85-95. [\[CrossRef\]](#)
62. Francisco, L.M., Sage, P.T., Sharpe, A.H. (2010). The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological Reviews*, 236, 219-242. [\[CrossRef\]](#)

63. Lunning, M., Vose, J., Nastoupil, L., Fowler, N., Burger, J.A., Wierda, W.G., Schreeder, M.T., Siddiqi, T., Flowers, C.R., Cohen, J.B., Sportelli, P., Miskin, H.P., Weiss, M.S., O'Brien, S. (2019). Ublituximab and umbralisib in relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 134(21), 1811-1820. [\[CrossRef\]](#)
64. Gingele, S., Jacobus, T.L., Konen, F.F., Hümmert, M.W., Sühs, K.W., Schwenkenbecher, P., Ahlbrecht, J., Möhn, N., Müschen, L.H., Bönig, L., Alvermann, S., Schmidt, R.E., Stangel, M., Jacobs, R., Skripuletz, T. (2018). Ocrelizumab depletes CD20<sup>+</sup> T cells in multiple sclerosis patients. *Cells*, 8(1), 12. [\[CrossRef\]](#)
65. Freeman, C.L., Sehn, L.H. (2018). A tale of two antibodies: obinutuzumab versus rituximab. *British Journal of Haematology*, 182(1), 29-45. [\[CrossRef\]](#)
66. Assouline, S., Buccheri, V., Delmer, A., Gaidano, G., Trneny, M., Berthillon, N., Brewster, M., Catalani, O., Li, S., McIntyre, C., Sayyed, P., Badoux, X. (2016). Pharmacokinetics, safety, and efficacy of subcutaneous versus intravenous rituximab plus chemotherapy as treatment for chronic lymphocytic leukaemia (SAWYER): a phase 1b, open-label, randomised controlled non-inferiority trial. *The Lancet. Haematology*, 3(3), e128-e138. [\[CrossRef\]](#)
67. William, B.M., Bierman, P.J. (2010). I-131 tositumomab. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 10(8), 1271-1278. [\[CrossRef\]](#)
68. Montalban, X., Hauser, S.L., Kappos, L., Arnold, D.L., Bar-Or, A., Comi, G., de Seze, J., Giovannoni, G., Hartung, H.P., Hemmer, B., Lublin, F., Rammohan, K.W., Selmaj, K., Traboulsee, A., Sauter, A., Masterman, D., Fontoura, P., Belachew, S., Garren, H., Mairon, N., Chin, P., Wolinsky, J.S., ORATORIO Clinical Investigators (2017). Ocrelizumab versus placebo in primary progressive multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 376(3), 209-220. [\[CrossRef\]](#)
69. Österborg, A., Udvardy, M., Zaritsky, A., Andersson, P.O., Grosicki, S., Mazur, G., Kaplan, P., Steurer, M., Schuh, A., Montillo, M., Kryachok, I., Middeke, J.M., Kulyaba, Y., Rekhman, G., Gorczyca, M., Daly, S., Chang, C.N., Lisby, S., Gupta, I. (2016). Phase III, randomized study of ofatumumab versus physicians' choice of therapy and standard versus extended-length ofatumumab in patients with bulky fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 57(9), 2037-2046. [\[CrossRef\]](#)
70. Jankowitz, R., Joyce, J., Jacobs, S.A. (2008). Anaphylaxis after administration of ibritumomab tiuxetan for follicular non-hodgkin lymphoma. *Clinical Nuclear Medicine*, 33(2), 94-96. [\[CrossRef\]](#)
71. Devonshire, V., Phillips, R., Wass, H., Da Roza, G., Senior, P. (2018). Monitoring and management of autoimmunity in multiple sclerosis patients treated with alemtuzumab: practical recommendations. *Journal of Neurology*, 265(11), 2494-2505. [\[CrossRef\]](#)
72. Caon, C., Namey, M., Meyer, C., Mayer, L., Oyuela, P., Margolin, D.H., Rizzo, M. (2015). Prevention and management of infusion-associated reactions in the comparison of alemtuzumab and Rebif® efficacy in multiple sclerosis (CARE-MS) program. *International Journal of MS Care*, 17(4), 191-198. [\[CrossRef\]](#)
73. Stone, G.W., Maehara, A., Witzensbichler, B., Godlewski, J., Parise, H., Dambrink, J.H., Ochala, A., Carlton, T.W., Cristea, E., Wolff, S.D., Brener, S.J., Chowdhary, S., El-Omar, M., Neunteufl, T., Metzger, D.C., Karwoski, T., Dizon, J.M., Mehran, R., Gibson, C.M., INFUSE-AMI Investigators (2012). Intracoronary abciximab and aspiration thrombectomy in patients with large anterior myocardial infarction: the INFUSE-AMI randomized trial. *JAMA*, 307(17), 1817-1826. [\[CrossRef\]](#)
74. van der Kolk, L.E., Grillo-López, A.J., Baars, J.W., Hack, C.E., van Oers, M.H. (2001). Complement activation plays a key role in the side-effects of rituximab treatment. *British Journal of Haematology*, 115(4), 807-811. [\[CrossRef\]](#)
75. Florou, D., Katsara, M., Feehan, J., Dardiotis, E., Apostolopoulos, V. (2020). Anti-CD20 agents for multiple sclerosis: Spotlight on ocrelizumab and ofatumumab. *Brain Sciences*, 10(10), 758. [\[CrossRef\]](#)

## 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 1 satır aralıkla yazılmalıdır. Yayımlı kabul edilen makaleler doğrudan “Microsoft Word” dosyası halinde çevrim içi 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 e-mail adresi belirtmeli ve ortalı yazılmalıdır. İlk sayfada başlıktan önce yukarıdan 5 satır aralığı bırakılmalıdır. Başlık ile Öz/Abstract arası 1.5 satır aralıkla yazılmalıdır. Sorumlu yazarın soyadının üstüne (\*) işareti konularak belirtilmelidir. Bu kişinin Adı Soyadı, açık adresi, 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 bir 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, 06560, 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 (**JPEG formatında**) makale içinde yerleşmiş ve **resimler 300 dpi veya daha yüksek çözünürlükte** olmalıdır. 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 ve bir satır aralıkta yazılmalıdır. Tabloya ait açıklama varsa tablonun altına 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. Şekil başlığı ve şekil arasında 6 nk aralık olmalıdır. Tablo ve Şekiller metin içine yerleştirilirken metin ile aralarında 18 nk aralık olmalıdır.

### 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 başlığı ve tablo arasında 6 nk aralık olmalıdır.



**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.

**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 (Yazı karakteri "Times New Roman" ve 11 punto, "1" aralık, ortalı)

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 bölümleri ifade eden başlıklar (Makalenin ilk başlığı hariç) **12 punto ile koyu olarak büyük harflerle ve sayfanın solundan başlanarak** yazılmalıdır. **GİRİŞ**'ten önce ve sonra sırasıyla 24 nk ve 6 nk aralık bırakılmalıdır. Diğer ana başlıklardan önce ve sonra sırasıyla 12 nk ve 6 nk aralık olmalıdır. Bölüm başlıkları ile metin arasında belirtilenin dışında ayrıca aralık **birakılmamalıdır.**

- **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 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 (aşağıda görüldüğü gibi) halinde makalenin özeti sunulmalıdır. Her bir alt başlık 10 punto, koyu, normal yazılmalıdır. Alt başlıkların içeriğindeki metinler *italik* yazılmalıdır. **ÖZ** ve **ABSTRACT** metni blok halinde sağdan ve soldan 1 cm boşluk bırakılarak yazılmalıdır.

## 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, 1sadır aralık, **bold/koyu** yazılmalı ve sola dayalı olmalıdır Alt başlıklarda numaralandırma sistemi **kullanılmamalıdır.** Alt başlıklardan önce ve sonra 6 nk aralık olmalıdır.
- **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. Yazar katkısı belirtilmeyecek alanlar için - işareti konulmalıdır.

**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: -

### • **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 belirtilmeli ve Etik Kurul Onayını makale gönderim sırasında yüklemelidir. 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 10 punto, “1” aralık, iki yana yaslı. Metinde, geçiş sırasına göre köşeli parantez içinde, örneğin: [1,6,9], [5-7] gibi numaralandırılmalı ve metin sonunda bu numaralara göre sıralanmalıdır. Alt başlıkların yanına kaynak belirtilmemelidir. Tablo içinde kaynak bildirilmesi gerekiyorsa metin içinde verildiği gibi belirtilmelidir.
- **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, cilt no, 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 **şağıdaki formatta DOI numarasını köprü olarak giriniz. Lütfen <https://www.crossref.org/>'da yer almayan makaleleri [\[CrossRef\]](#) şeklinde belirtmeyiniz.**  
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90403-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90403-6)

**Örnekler:**

1. Martinez, M.J.A., Del Olmo, L.M.B., Benito, P.B. (2005). Antiviral activities of polysaccharides from natural sources. *Studies in Natural Products Chemistry*, 30, 393-418. [\[CrossRef\]](#)
2. Bahiense, J.B., Marques, F.M., Figueira, M.M., Vargasa, T.S., Kondratyuk, T.P., Endringer, D.C., Scherer, R., Fronza, M. (2017). Potential anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activities of *Sambucus australis*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 991-997. [\[CrossRef\]](#)

• **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). Erişim adresi <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.

- **Patent için:** Yazarın soyadı, adının baş harfleri, yıl yazar isimlerinden sonra (parantez içinde) yazılıp nokta işareti konmalıdır. Patent başlığı ve patent numarası yazılmalıdır.

**Örnek:**

Mahoney, S., Molz, L., Narayan, S., Saiah, E. (2018). Heteroaryl RHEB Inhibitors and Uses Thereof. WO 2018/191146 A1.

## **Etik İlkeler ve Yayın Politikası**

### **Editörün Sorumlulukları**

#### **Yayın politikası:**

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, açık erişimli, hakemli bir dergi olup Türkçe veya İngilizce olarak farmasötik bilimler alanındaki önemli gelişmeleri içeren orijinal araştırmalar, derlemeler ve kısa bildirimler için uluslararası bir yayım ortamıdır.

Editör, dergiye gönderilen makalelerden hangilerinin yayınlanması gerektiği kararından tek başına sorumludur. Editörün kararı, derginin editör kurulunun prensipleri doğrultusunda olabileceği gibi, onur kırıcı yayın yapmak, telif hakkı ihlali ve intihal gibi konularla ilgili olarak yürürlükte olan yasal gereklilikler ile sınırlandırılmıştır. Editör, karar verirken editör kurulunun üyelerine ya da hakemlere danışabilir. Makale yayımlanmadan önce yazarların yayımcıya makalenin “*Copyright Transfer Form*”unu doldurarak telif hakkını göndermesi gerekmektedir. Dergiye gönderilen makaleler editör ve editör yardımcıları tarafından biçimsel olarak incelenir. Dergi kurallarına göre hazırlanmamış makaleler kesinlikle değerlendirmeye alınmayarak reddedilmektedir.

#### **Yayın değerlendirmesi:**

Editör, yayın değerlendirme sürecinin adil, tarafsız ve zamanına uygun şekilde gerçekleştiğini garanti altına almaktadır. Araştırma makaleleri genel olarak dışardan ve bağımsız en az iki hakem ile değerlendirilmekte ve gerek olması durumunda editör üçüncü bir hakemden ek görüş istemektedir. Editör, gerekli, kapsayıcı ve çeşitli düzeylerde değerlendirmelere ihtiyaç duyulacağını göz önüne alarak, ilgili alanda uygun uzmanlığı olan hakemler seçmektedir. Editör, olası çıkar çatışmaları için yapılan açıklamaları, hakemler tarafından yapılan “*self-citation*” önerilerini ve herhangi bir taraflılık olasılığını değerlendirmek ve karar vermek için dikkatli bir şekilde gözden geçirmektedir.

Editör, bir makaledeki hataları yayınlanmadan önce tespit ederse düzeltmeli, daha sonra tespit edilmesi durumunda ise düzeltmeleri yayınlamalıdır. Tüm düzeltme veya geri çekme bildirimleri, dergide belirgin bir şekilde yayınlanmalı ve orijinal makaleye veya özete tam bibliyografik referansı içermelidir. Ayrıca içindekiler sayfasında listelenmeli ve belirgin bir şekilde etiketlenmelidir (ör. Yazım hatası, geri çekme veya özür dileme).

#### **Adil değerlendirme:**

Editör, makaleleri yazarların ırk, cinsiyet, cinsel eğilim, inanç, etnik köken, vatandaşlık ya da politik görüşlerine bakmaksızın bilimsel içeriklerine göre değerlendirmektedir. Derginin editöryal prensipleri şeffaf ve tümüyle dürüst değerlendirmeyi desteklemektedir. Editör, hakemlerin ve yazarların kendilerinden beklenen tam olarak anladıklarından emin olmalıdır. Editör, dergi ile ilgili tüm iletişimini derginin elektronik başvuru sisteminden yapmaktadır. Editör, editöryal kararlara itiraz durumunda şeffaf bir mekanizma işletmektedir.

#### **Gizlilik ilkesi:**

Editör, dergiye yapılan başvurudaki tüm materyallerin ve hakemlerle yapılan tüm iletişimin gizliliğini (ilgili yazar ve hakemlerle aksi onaylanmadığı sürece) korumakla yükümlüdür. Hakemler isimlerinin açıklamasını kabul etmediği sürece, editör, hakemlerin kimliklerini korumaktadır. Başvurusu tamamlanmış bir makaleye ait basılmamış materyaller, yazarın yazılı onayı alınmadan editörün kendi çalışmaları/araştırmaları için kullanılmamalıdır. Değerlendirme sürecinde edinilen ayrıcalıklı bilgi ya da fikirler gizli tutulmalı ve kişisel amaçlar için kullanılmamalıdır.

### **Hakemlerin Sorumlulukları**

#### **Editöryal kararlara katkı:**

Etik ile ilgili sorumluluklara ek olarak, hakemlerin yazarlara ve sundukları çalışmalara uygun şekilde davranmaları ve iyi bir değerlendirme performansı göstermeleri istenmektedir. Makalede yer alan araştırmayı değerlendirmeye yetkin olmadığını düşünen ya da verilen sürede değerlendirmeyi yapamayacağını farkedenden hakemin, editörü bilgilendirmesi ve değerlendirme sürecinden çıkartılması gerekmektedir.

#### **Gizlilik:**

Hakemler makale hakkındaki değerlendirmelerini ya da bilgilerini hiç kimseye paylaşmamalı, editörden izin almadan yazar ile iletişime geçmemelidirler. Başvurusu tamamlanmış bir makaleye ait basılmamış materyaller, yazarın yazılı onayı alınmadan hakemin kendi çalışmaları/araştırmaları için

kullanılmamalıdır. Değerlendirme sürecinde edinilen bilgi ya da fikirler gizli tutulmalı ve kişisel amaçlar için kullanılmamalıdır.

#### **Etik sorunları farketme:**

Hakem, makalede yer alan olası etik sorunları farketmeli ve editörün dikkatine sunmalıdır. Bahsedilen olası sorunlar içinde, değerlendirmede olan makale ile daha önce basılmış bir makale arasındaki önemli ölçüdeki benzerlik ya da örtüşme de bulunmaktadır. Daha önce yayınlanmış olan herhangi bir gözlem ve/veya argüman, ilgili kaynak/referans ile birlikte verilmelidir.

#### **Tarafsızlık ve rekabet standartları:**

Hakemler tarafsız olarak değerlendirmelerini yapmalıdırlar. Hakemler, makale değerlendirmesi sırasında önyargılı olabilecekleri konusunda farkında olmalıdırlar. Yazarın kişi olarak eleştirilmesi uygun değildir. Hakemler görüşlerini destekleyici argümanlarla ifade etmelidirler. Hakemler makaleyi değerlendirmeyi kabul etmeden önce olası çıkar çatışması durumuna karşı (makale ile ilişkili yazar, şirket ya da kurum ile rekabetçi, işbirliği içinde olan ya da diğer ilişkiler/bağlantılar için) editöre bilgi vermelidirler. Hakem, yazarın hakemin (ya da hakemle birlikte çalışan kişilerin) çalışmalarının kaynak olarak alındığını ileri sürerse, gerçek bilimsel gerekçeler sunulmalı, bu durumun hakemin kaynak gösterilme sayısını ya da çalışmalarının görünürlüğünü arttırmaya yönelik bir girişim olmamasına özen gösterilmelidir.

### **Yazarın Sorumlulukları**

#### **Bildirim standartları:**

Orijinal araştırmanın makalesini hazırlayan yazarlar, çalışmanın önemine ilişkin tarafsız bir tartışma ile gerçekleştirilen araştırmayı net bir şekilde sunmalıdırlar. Makalede veri açık bir şekilde sunulmalıdır. Çalışma, diğer araştırmacıların çalışmayı tekrar edebilmesine izin verecek şekilde yeterli detay ve kaynak içermelidir. Yanıltıcı ya da bilinçli olarak net olmayan ifadelerin verilmesi etik olmayan davranış olarak görülür ve kabul edilmemektedir.

#### **Veri ulaşımı ve saklama:**

Yazarlardan editöryal değerlendirme için makalelerini destekleyici araştırma verisi istenebilir. Yazarların belirtilen veriyi erişime açmaları, yayımlandığı tarihten belli bir süre sonra da gerekli görülmesi durumunda belirtilen veriyi sunabilmeleri gerekmektedir.

#### **Orijinallik, intihal ve kaynakların belirtilmesi:**

İntihal, yazarın başka bir makaleyi kendi çalışması olarak göstermesi, kaynak göstermeden başka birine ait çalışmanın belli bölümlerinin kopyalanması ya da başka sözcüklerle anlatılması veya başkaları tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarının alınarak sunulması şeklinde olabilir. İntihalin her biçimi etik olmayan davranıştır ve kesinlikle kabul edilmemektedir. Yazarlar çalışmalarının tümüyle orijinal olduğunu garanti etmelidirler. Eğer yazarlar başkalarına ait iş ve/veya metinleri kullanıyorlarsa, mutlaka uygun şekilde kaynak ya da alıntı gösterilmeli ve gerekliyse izin alınmalıdır. Yazarlar kendilerine ait olan çalışmayı etkileyen ve çalışmaya ait uygun içeriğin oluşturulmasında katkısı olan tüm yayınları veya eserleri kaynak olarak göstermelidirler. Özel olarak (görüşme, yazışma ya da üçüncü taraflar ile tartışma) ile elde edilen bilgiler kullanılmamalı ya da kullanılacaksa izin alınarak bildirilmelidir. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi'ne yayımlanmak üzere gönderilen tüm makaleler, yazarlar tarafından, intihal tarama programları ile taranmış olmalıdır.

#### **Çoklu, gereksiz ve tekrar yayınlama:**

Aynı makale ile birden fazla dergiye başvuruda bulunmak etik olmayan bir davranıştır ve asla kabul edilmemektedir. Genel olarak, yazar daha önce basılmış bir yayını, özet formunda ya da yayınlanmış bir ders, akademik tez ya da elektronik ön baskının bir parçası olması dışında, değerlendirme için başka bir dergiye göndermemelidir.

#### **Yazar katkıları:**

Yazar katkıları, çalışmanın konseptine, tasarımına, gerçekleştirilmesine ya da yorumlanmasına önemli katkı sağlayan kişiler ile sınırlandırılmalıdır. Belirtilen süreçlere önemli katkı sağlayan kişiler eşyazar (co-author) olarak belirtilmelidir. Çalışmaya başka açılardan (dil düzenlemesi ya da tıbbi yazım gibi) katkı sunan kişiler "Teşekkür" (Acknowledgement) bölümünde yer almalıdırlar. Sorumlu yazar, tüm eşyazarların çalışmada uygun şekilde yer aldığına, tüm eşyazarların çalışmayı görüp onayladıklarına ve yayınlanmak üzere başvuru yapılmasına dair verdikleri onaya ilişkin sorumluluğu üstlenmelidir. Yazarlar, makale başvurusu yapmadan önce yazar listesini ve sıralamasını dikkatli bir şekilde değerlendirmeli ve orijinal başvuru sırasında kesin bir yazar listesi sunmalıdırlar. Çalışmanın başvurusu

tamamlandıktan sonra, sadece istisna durumlarda, editör yazar listesinde ekleme, silme ya da yeniden düzenleme yapabilir. Tüm yazarlar bu şekilde yapılacak ekleme, silme ve yeniden düzenleme konusunda fikir birliği içinde olmalıdırlar. Tüm yazarlar çalışmanın ortak sorumluluğunu aldıklarını kabul ederler. Her yazar, uygun şekilde araştırılan ve karara bağlanan çalışmanın kesinliği ve bütünlüğü ile ilişkili sorulardan sorumludur. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisine makale ile birlikte “Yazar Katkı Formu”nun da doldurulup gönderilmesi gerekmektedir.

#### **Çıkar çatışması beyanı:**

Tüm yazarlar, çalışmalarını uygunsuz bir şekilde etkileyebilecek olarak gördükleri diğer kişi veya organizasyonlarla her türlü maddi ve kişisel ilişkilerini beyan etmelidirler. Araştırmanın yürütülmesinde ve/veya makalenin hazırlanmasında maddi destek sağlayan tüm kaynaklar ile çalışmanın planlanması, verinin toplanması, analizi ve yorumlanması, raporlanması ve makalenin yayın için başvurma kararının alınmasında rol oynayan kişi ve/veya kurumlar belirtilmelidir. Fon kaynaklarının belirtilen şekilde bir katkısı olmamışsa, bu durum da ifade edilmelidir. Açıklanması gereken potansiyel çıkar çatışmalarına örnek olarak istihdam, danışmanlıklar, hisse sahipliği, ücret, ücretli uzman tanıklığı, patent başvuruları/tescilleri ve hibeler veya diğer fonlar sayılabilir. Olası çıkar çatışmaları mümkün olan en erken aşamada açıklanmalıdır.

#### **Temel hataların bildirimi:**

Yazar, yayınlanmış olan bir çalışmada önemli bir hata ya da eksiklik farketdiğinde, acil olarak dergi editörüne/yayınevine bildirmek ve editör tarafından gerekli görülmesi durumunda makaleyi geri çekmek veya düzeltmek için editörle işbirliği yapmak ile yükümlüdür. Editör/yayınevi yayınlanmış olan makalenin bir hata içerdiğini üçüncü bir taraftan öğrenirse, editör ile işbirliği yapmak ve gerektiğinde destekleyici kanıt sağlamak, yazarın yükümlülüğüdür.

#### **Olası riskler ve insan veya hayvan konuları:**

Eğer kullanımları sırasında olağandışı risk yaratan kimyasallar, işlemler ya da malzemeler çalışmada yer alıyorsa, yazar bu durumu metin içinde açıkça belirtmelidir. 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 sağlamalıdırlar. 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. Etik kurul raporu alınması gerektiği halde, etik kurul raporu olmayan çalışmalar reddedilecektir. İnsanlar veya insandan elde edilen örnekler üzerinde yapılan klinik araştırmalarda bilgilendirilmiş onam formu mutlaka alınmış olmalıdır ve gereç ve yöntem kısmında belirtilmelidir. İnsan gönüllüleri ile yapılan araştırmalar için araştırma protokolüne uygun olarak hazırlanmış yazılı bilgilendirilmiş gönüllü onam formu alınmalıdır. İnsanlar üzerinde gerçekleştirilen tüm araştırmalar Helsinki Bildirgesi ilkelerine göre yapılmalıdır ([World Medical Association \(WMA\) Helsinki Declaration for Medical Research in Human Subject](#)). Tüm hayvan çalışmaları ARRIVE kılavuzuna uygun olmalı ([Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments \(ARRIVE\) Guidelines](#)) ve “Bilimsel Amaçlı Kullanılan Hayvanların Korunmasına İlişkin Konsey Direktifi”ne ([EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#)), “Birleşik Krallık Hayvan Yasası”na ([The U.K. Animals \(Scientific Procedures\) Act 1986](#)) ve/veya “U.S. İnsan Bakımı ve Laboratuvar Hayvanlarının Kullanımına İlişkin Halk Sağlığı Hizmeti Politikası” rehberine ([U.S. Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals](#)) uygun şekilde yürütülmelidir. Bitkiler ile ilgili tüm deneysel araştırmalar, uluslararası yönergelere uygun olmalıdır.

## 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 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 title of the manuscript the name/s and the full address/es of the author/s, and the full address, telephone number, e-mail address of the corresponding author should be written and all should be centered in the text. It should be indicated by placing (\*) above the surname of the corresponding author. Name, surname, full address, 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, 06560, 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.) should be numbered below with Arabic numbers (**Figure 1., Table 2.**) 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 JPEG format**) must be placed in the article and pictures must be at least **300 dpi or in higher resolution**. 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 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. There must be **6 nk** space between the figure and figure title. There should be **18 nk** space between the text and title of figure and/or table.

**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**. There must be **6 nk** space between the table and table title.



**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.

**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.

**Example for figure:**



**Figure 1.** General view of *C. Nummularia* (The font size must be 11 pt with 1 line spacing and “Times New Roman” font, and must be centered in the text)

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**. 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 24 nk space before and 6 nk space after the INTRODUCTION**. For, there should be 12 nk space before and 6 nk space after the other titles. Between the chapter titles and the text, a separate space **should not be left** other than the specified in this document.

- **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 written in blocks with 1 cm margins from the right and left.

**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. **If there is not any author contribution for the specified sections, “-“ should be added.** Please see below example for writing author contributions.

*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: -

- **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. Approval from the ethics committee should be uploaded during the manuscript submission. 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 10 font size, "1" spacing, justified. In the text, it should be numbered in square brackets according to the order of appearance, such as: [1,6,9], [5-7] 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.
  - **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, volume number, if available, the number (in parentheses), 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. Please do not add CrossRef hyperlink if the article is not listed at <https://www.crossref.org/>.**  
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90403-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90403-6)

**Examples:**

1. Martinez, M.J.A., Del Olmo, L.M.B., Benito, P.B. (2005). Antiviral activities of polysaccharides from natural sources. *Studies in Natural Products Chemistry*, 30, 393-418. **[CrossRef]**
2. Bahiense, J.B., Marques, F.M., Figueira, M.M., Vargasa, T.S., Kondratyuk, T.P., Endringer, D.C., Scherer, R., Fronzaa, M. (2017). Potential anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activities of *Sambucus australis*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 991-997. **[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. Retrieved August 12, 2005, from <http://www.bmj.com/cgi/content/full/317/7150/>

• **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.

- **For patent:** 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. The title and number of the patent should be indicated.

***Example:***

Mahoney, S., Molz, L., Narayan, S., Saiah, E. (2018). Heteroaryl RHEB Inhibitors and Uses Thereof. WO 2018/191146 A1.

## **Ethical Principles and Publication Policy**

### **Responsibilities of Editors**

#### **Editorial policy:**

The Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University 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.

The editor is solely responsible for deciding which of the articles submitted to the journal should be published. The editor may be guided by the policies of the journal's editorial board and constrained by such legal requirements as shall then be in force regarding issues such as libel, copyright infringement and plagiarism. The chief editor may confer with members of editorial board or reviewers in making these decisions. Articles submitted to the journal are subject to a formal preliminary review by the chief editor and associate editors. Articles that were not prepared according to the journal rules are not evaluated and rejected immediately. When the article is published, the authors are considered to transfer all rights of the manuscript to the Publisher.

#### **Peer review:**

The editor shall ensure that the peer review process is fair, unbiased, and timely. Research articles must typically be reviewed by at least two external and independent reviewers, and where necessary the editor should seek additional opinions from a third reviewer. The editor shall select reviewers who have suitable expertise in the relevant field, taking account of the need for appropriate, inclusive and diverse representation. The editor shall review all disclosures of potential conflicts of interest and suggestions for self-citation made by reviewers in order to determine whether there is any potential risk for bias.

Editors should correct any errors in an article before publication, and then publish corrections if detected later. All correction or retraction notices must be prominently published in the journal and include the full bibliographic reference to the original article or abstract. It should also be listed on the table of contents and prominently labeled (e.g. typo, retraction or apology).

#### **Fair play:**

The editor should evaluate manuscripts for their intellectual content without regard to race, gender, sexual orientation, religious belief, ethnic origin, citizenship, or political philosophy of the authors. The editorial policies of the journal should encourage transparency and completeness, honest reporting, and the editor should ensure that peer reviewers and authors have a clear understanding of what is expected of them. The editor shall use the journal's standard electronic submission system for all journal communications. The editor shall establish a transparent mechanism for appeal against editorial decisions.

#### **Confidentiality:**

The editor must protect the confidentiality of all material submitted to the journal and all communications with reviewers, unless otherwise agreed with the relevant authors and reviewers. Unless reviewers have agreed to disclose their names, the editor must protect reviewers' identities. Unpublished materials disclosed in a submitted manuscript must not be used in an editor's own research without the express written consent of the author. Privileged information or ideas obtained through peer review must be kept confidential and not used for personal advantage.

### **Responsibilities of Reviewers**

#### **Contribution to editorial decisions:**

In addition to the specific ethics-related duties, reviewers are asked generally to treat authors and their work in a good way and to observe good reviewing etiquette. Any selected referee who feels unqualified to review the research reported in a manuscript or knows that its review will be impossible should notify the editor and decline to participate in the review process.

#### **Confidentiality:**

Reviewers must not share the review or information about the paper with anyone or contact the authors directly without permission from the editor. Unpublished materials disclosed in a submitted manuscript must not be used in a reviewer's own research without the express written consent of the author. Information or ideas obtained through peer review must be kept confidential and not used for personal advantage.

#### [Awareness to ethical issues:](#)

A reviewer should be aware of potential ethical issues in the article and should present to the editor, including any substantial similarity or overlap between the manuscript under consideration and any other publication. Any statement that an observation and/or argument had been previously reported should be accompanied by the relevant citation.

#### [Standards of objectivity and competing interests:](#)

Reviews should be conducted objectively. Reviewers should be aware of any personal bias they may have and take this into account when reviewing a paper. Personal criticism of the author is inappropriate. Referees should express their views clearly with supporting arguments. Reviewers should consult the Editor before agreeing to review a paper where they have potential conflicts of interest resulting from competitive, collaborative, or other relationships or connections with any of the authors, companies, or institutions connected to the papers. If a reviewer suggests that an author includes citations to the reviewer's (or their associates') work, this must be for genuine scientific reasons and not with the intention of increasing the reviewer's citation count or enhancing the visibility of their work (or that of their associates).

### **Responsibilities of Authors**

#### [Reporting standards:](#)

Authors who prepare the article of the original research should present an accurate account of the work performed as well as an objective discussion of its significance. Underlying data should be represented accurately in the paper. A paper should contain sufficient detail and references to permit others to replicate the work. Fraudulent or knowingly inaccurate statements constitute unethical behavior and are unacceptable.

#### [Data access and retention:](#)

Authors may be asked to provide the research data supporting their manuscript for editorial review. Authors should be prepared to provide access to such data, and should be able to present such data for a reasonable number of years after publication.

#### [Originality, plagiarism and acknowledgement of sources:](#)

Plagiarism can be present such as introducing another's paper as the author's own paper, copying or paraphrasing substantial parts of another's paper (without attribution), publishing results from research performed by others. Any type of plagiarism is unacceptable and considered as unethical behavior. The authors should ensure that they have written original works entirely, and if the work and/or words of others have been used, this should be appropriately cited and permission should be obtained where necessary. Authors should cite publications that have inspired the published work and place it in comparison within the rest of the scholarly record. Information obtained privately such as from a conversation, correspondence, or discussion with third parties, must not be used or reported without any explicit, written permission from the source. All manuscripts submitted for publication to the Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University should be scanned by the plagiarism screening programs.

#### [Multiple, redundant or concurrent publication:](#)

It is unethical and unacceptable when the same manuscript is submitted to more than one journal at the same time. Author should not submit for consideration in another journal a paper that has been published previously, except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint.

#### [Authorship of the paper:](#)

Authorship should be limited to those who have made a significant contribution to the conception, design, execution, or interpretation of the reported study. All those who have made substantial contributions should be listed as co-authors. Where there are others who have participated in certain substantive aspects of the paper (e.g. language editing or medical writing), they should be recognized in the acknowledgements section. The corresponding author should ensure that all appropriate co-authors are included on the paper, and that all co-authors have seen and approved the final version of the paper and have agreed to its submission for publication. Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Only in exceptional circumstances will the Editor consider (at their discretion) the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been submitted. All authors must agree with any such addition, removal or rearrangement. Authors take collective



responsibility for the work. Each individual author is accountable for ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. The “Author Contribution Form” must be filled out and sent to the Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University together with the article.

#### [Declaration of competing interests:](#)

All authors should disclose in their manuscript any financial and personal relationships with other people or organizations that could be viewed as inappropriately influencing (bias) their work. All sources of financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article should be disclosed, as should the role of the people and/or foundation, if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Examples of potential conflicts of interest which should be disclosed include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Potential conflicts of interest should be disclosed at the earliest possible stage.

#### [Notification of fundamental errors:](#)

When an author discovers a significant error or inaccuracy in their own published work, it is the author’s obligation to promptly notify the journal editor or publisher and cooperate with the editor to retract or correct the paper if deemed necessary by the editor. If the editor or the publisher learn from a third party that a published work contains an error, it is the obligation of the author to cooperate with the editor, including providing evidence to the editor where requested.

#### [Hazards and human or animal subjects:](#)

If the work involves chemicals, procedures or equipment that have any unusual hazards inherent in their use, the author must clearly identify these in the manuscript. If the study involves the use of animal or human subjects/volunteers, the author should guarantee that the manuscript contains a statement that all procedures were performed in compliance with relevant laws and institutional guidelines and that the appropriate institutional committee(s) including ethics committee have approved them. In studies where ethics committee approval is mandatory, the name and ethics committee approval number of the institution for which ethics committee approval has been obtained should be specified in the material and method section of the manuscript. It should also be stated in the material and method section of the manuscript that the protocols and procedures used are ethically reviewed and approved by the ethics committee. If the studies requiring an ethics committee report are submitted without it, they will be immediately rejected. Informed consent form must be taken in clinical studies including human and/or human subjects and should be stated in the material and method section. For studies including human volunteers, written informed consent form prepared in compliance with the study protocol should be obtained. All trials performed on humans should be carried out according to the Helsinki Declaration principles ([World Medical Association \(WMA\) Helsinki Declaration for Medical Research in Human Subject](#)). All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines ([Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments \(ARRIVE\) Guidelines](#)) and should be carried out in accordance with EU Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes ([EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#)), the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act 1986 ([The U.K. Animals \(Scientific Procedures\) Act 1986](#)) or the U.S. Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals ([U.S. Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals](#)). All experimental research on plants should comply with international guidelines.

**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

- Duygu BAYRAMOĞLU, Merve DEMİRBÜĞEN ÖZ, Merve Eylül KIYMACI - **THE COMPARISON OF ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF NOVEL PYRIMIDO[1,2-a]PYRIMIDINE COMPOUNDS** - *YENİ PİRİMİDO[1,2-a]PİRİMİDİN BİLEŞİKLERİNİN ANTİOKSİDAN VE ANTİBAKTERİYAL ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI* 1
- Meliha GÜNEŞ, Gökçe TURAN, Armağan DÖNMEZER, Fadime AYDIN KÖSE, Özgen ÖZER, Sinem Yaprak KARAVANA - **MUCOADHESIVE ORODISPERSIBLE FILM FORMULATIONS OF RASAGILINE MESYLATE FOR PARKINSON TREATMENT** - *PARKİNSON TEDAVİSİ İÇİN RASAJİLİN MESİLAT MUKOADEZİF AĞIZDA DAĞILAN FİLM FORMÜLASYONLARI* 9
- Nazlı TURAN YÜCEL, Ümmühan KANDEMİR, Umut İrfan ÜÇEL, Özgür Devrim CAN, Ümide DEMİR ÖZKAY - **REBOKSETİN'İN DİYABETİK SIÇANLARDA BOZULMUŞ DAVRANIŞ PARAMETRELERİ ÜZERİNDEKİ YARARLI ETKİLERİ** - *BENEFICIAL EFFECTS OF REBOXETINE ON IMPAIRED BEHAVIORAL PARAMETERS OF DIABETIC RATS* 20
- Heybet Kerem POLAT, Sedat ÜNAL - **DEVELOPMENT OF BESIFLOXACIN HCL LOADED OCULAR IN SITU GELS; IN VITRO CHARACTERIZATION STUDY** - *BESİFLOKSASİN HCL YÜKLÜ OKÜLER İN SİTU JELLERİN GELİŞTİRİLMESİ; İN VİTRO KARAKTERİZASYON ÇALIŞMASI* 39
- Tugce DEMIROZ AKBULUT, Sura BAYKAN - **EGE BÖLGESİ'NDE YAYILIŞ GÖSTEREN MARRUBIUM L. (LAMIACEAE) TAKSONLARININ MORFOLOJİK VE MİKROMORFOLOJİK YÖNDEN İNCELENMESİ** - *MORPHOLOGICAL AND MICROMORPHOLOGICAL INVESTIGATION OF MARRUBIUM L. (LAMIACEAE) TAXONS DISTRIBUTED IN THE AEGEAN REGION* 51
- Bilge SÖZEN ŞAHNE, Elif ULUTAŞ DENİZ, Leyla YUMRUKAYA, Melih ELÇİN, Selen YEĞENOĞLU - **MESLEKLER ARASI EĞİTİME GENÇ BAKIŞ: SİMÜLASYON UYGULAMASINA YÖNELİK ÖĞRENCİ GÖRÜŞLERİ** - *A YOUTH VIEW ON INTERPROFESSIONAL EDUCATION: STUDENT OPINIONS ON SIMULATION PRACTICES* 76
- Nuraniye ERUYGUR, Fatma AYAZ - **EXAMINATION OF THE AERIAL PARTS OF CLINOPODIUM PAMPHYLICUM SUBSP. DAVISII (CONTANDR. & QUÉZEL) GOVAERTS IN TERMS OF ANTIOXIDANT AND ENZYME INHIBITION POTENTIALS, TOGETHER WITH PHENOLIC PROFILE** - *CLINOPODIUM PAMPHYLICUM SUBSP. DAVISII (CONTANDR. & QUÉZEL) GOVAERTS TOPRAK ÜSTÜ KISIMLARININ ANTİOKSİDAN VE ENZİM İNHİBİSYON POTANSİYELİ VE FENOLİK PROFİLİNİN İNCELENMESİ* 86
- Hakan BALCI, Zehra Özden ERDOĞAN, Alperen ÖZDEMİR - **SİPROFLOKSASİN TAYİNİ İÇİN NANOPARTİKÜL TEMELLİ DUYARLI SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ** - *DEVELOPMENT OF NANOPARTICLE BASED SENSITIVE SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF CIPROFLOXACIN* 95
- Hilal Basak EROL, Banu KASKATEPE, Nurten ALTANLAR, Sulhiye YILDIZ, Suleyman YALCIN - **GENETIC DIVERSITY OF ACINETOBACTER BAUMANNII STRAINS ISOLATED FROM DIFFERENT HOSPITALS** - *FARKLI HASTANELERDEN İZOLE EDİLEN ACINETOBACTER BAUMANNII SUŞLARININ GENETİK* 104

## ÇEŞİTLİLİĞİ

- Tugce GUR MAZ, Sumeyye TURANLI, H. Burak CALISKAN - **DESIGN AND SYNTHESIS OF SOME ARYLHYDRAZONE DERIVATIVES AS POTENTIAL FAAH INHIBITORS** - *POTANSİYEL FAAH İNHİBİTÖRÜ OLARAK BAZI ARİLHİDRAZON TÜREVİ BİLEŞİKLERİN TASARIMI VE SENTEZİ* 111
- Merve İNCİ ÇAMÇI, Meral ERDİNÇ, İlker KELLE, Emre UYAR, Levent ERDİNÇ - **THE EFFECTS OF MELATONIN, FLUOXETINE AND THEIR COMBINATIONS ON STRESS-INDUCED BEHAVIORAL AND COGNITIVE IMPAIRMENTS IN MICE** - *FARELERDE STRESİN NEDEN OLDUĞU DAVRANIŞSAL VE KOGNİTİF BOZUKLUKLARA MELATONİN, FLUOKSETİN VE KOMBİNASYONLARININ ETKİSİ* 120
- Meliha EKİNCİ, Derya İLEM-ÖZDEMİR - **CELL INCORPORATION STUDY OF [<sup>99m</sup>Tc]Tc-NAB-PACLITAXEL ON HUMAN COLORECTAL ADENOCARCINOMA CELL LINE** - *[<sup>99m</sup>Tc]Tc-NAB-PAKLİTAKSEL'İN İNSAN KOLOREKTAL ADENOKARSİNOMA HÜCRE HATTI ÜZERİNDE HÜCRE BAĞLANMA ÇALIŞMASI* 133
- Manish GOYANI, Meghraj SURYAWANSHI, Ridhdhesh JIVAWALA - **FORMULATION AND EVALUATION OF PARENTERAL IN-SITU FORMING BIODEGRADABLE IMPLANT FOR CONTROLLED RELEASE OF LEVOTHYROXINE SODIUM** - *LEVOTİROKSİN SODYUMUN KONTROLLÜ SALIMI İÇİN IN-SITU PARENTERAL BİYBOZUNUR İMPLANT FORMÜLASYONU VE DEĞERLENDİRİLMESİ* 141
- Burçin ERGENE, Damla HADDUR, Melek KARAASLAN, Kamuran İLERİ ÖZLER, Gülçin SALTAN İŞCAN - **PİYASADA BULUNAN BAZI UÇUCU YAĞLARIN FARMAKOPE UYGUNLUĞUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ** - *EVALUATION OF PHARMACOPOEIA COMPLIANCE OF SOME ESSENTIAL OILS IN THE MARKET* 157
- Eldrin DLR. ARGUELLES - **CHEMICAL COMPOSITION AND IN VITRO ANALYSIS OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ACUTODESMUS DIMORPHUS (TURPIN) P.M. TSARENKO (SCENEDESMACEAE, CHLOROPHYTA)** - *ACUTODESMUS DIMORPHUS (TURPIN) P.M. TSARENKO (SCENEDESMACEAE, CHLOROPHYTA)'NİN KİMYASAL BİLEŞİMİ VE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİNİN İN VİTRO ANALİZİ* 168
- Fatma Tuğçe GÜRAĞAÇ DERELİ, Evren ARIN, Ebru ÖNEM - **EVALUATION OF THE POTENTIAL ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF BERBERIS CRATAEGINA DC.: BY FOCUSING ON QUORUM SENSING INHIBITION OF CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM ATCC 12472** - *BERBERIS CRATAEGINA DC'NİN ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE POTANSİYELİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ: CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM ATCC 12472'DE ÇEVREYİ ALGILAMA SİSTEMİ İNHİBİSYONUNA ODAKLANARAK* 178
- Derya DOĞANAY, Müzeyyen AYDIN, İbrahim Serkan AVŞAR - **FARKLI KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLMİŞ KLEBSIELLA PNEUMONIAE İZOLATLARININ ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLİNİN İNCELENMESİ: COVID-19 PANDEMİSİ SÜRECİNDEKİ BİR YILLIK VERİLER** - *INVESTIGATION OF THE ANTIBIOTIC RESISTANCE PROFILE OF KLEBSIELLA PNEUMONIAE ISOLATES ISOLATED FROM DIFFERENT CLINICAL SPECIMENS: ONE-YEAR DATA DURING THE COVID-19 PANDEMIC PROCESS* 185
- Dilek YONAR, Burcu BABA, Arzu KARAYEL - **EVALUATION OF ZERUMBONE AS AN EGFR TYROSINE KINASE INHIBITOR BY MOLECULAR DOCKING METHOD** - *MOLEKÜLER YERLEŞTİRME YÖNTEMİYLE ZERUMBONUN EGFR TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRÜ OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ* 196
- Ümit ERDOĞAN - **PROPOLİS EKSTRAKTI BİTKİSEL YAĞLARIN OKSİDATİF STABİLİTESİNİ İYİLEŞTİRMEK İÇİN DOĞAL BİR ANTİOKSİDAN OLARAK ÖNERİLEBİLİR** - *PROPOLIS EXTRACT COULD BE RECOMMENDED AS A NATURAL ANTIOXIDANT TO IMPROVE VEGETABLE OIL OXIDATIVE STABILITY* 208
- Damla KIRCI, Betül DEMİRCİ - **COMPARISON OF ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF SOME POLYPHENOLIC COMPOUNDS AND THEIR BIOTRANSFORMATION EXTRACTS** - *BAZI POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN VE BİYOTRANSFORMASYON EKSTRELERİNİN ANTİOKSİDAN VE ANTI-ENFLAMATUVAR AKTİVİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI* 220

Igor BELENICHEV, Pavlo BAK, Olena POPAZOVA, Victor RYZHENKO, Nina BUKHTIYAROVA, Andrii PUZYRENKO - <b>INTEGRATIVE AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN RATS IN THE SIMULATION OF DOXORUBICIN CHRONIC HEART FAILURE AND DURING THE USE OF B-ADRENERGIC BLOCKERS</b> - <i>DOKSORUBİSİN İLE OLUŞTURULAN KRONİK KALP YETMEZLİĞİ MODELİNDE VE B-ADRENERJİK BLOKERLERİN KULLANIMI SIRASINDA SIÇANLARDA BÜTÜNLEYİCİ VE BİYOKİMYASAL PARAMETRELER</i>	228
Buket ALTINOK GUNES - <b>INTEGRATED BIOINFORMATIC ANALYSIS TO EVALUATE TARGET GENES AND PATHWAYS IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA</b> - <i>ENTEĞRE BİYOİNFORMATİK ANALİZ İLE KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİDE HEDEF GENLERİN VE YOLAKLARIN BELİRLENMESİ</i>	239
Şükran ÖZTÜRK - <b>ANTİVİRAL İLAÇLARIN HASTANE ENFEKSİYON ETKENİ PSEUDOMONAS AERUGINOSA ÜZERİNDE SİNERJİSTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI</b> - <i>INVESTIGATION OF THE SYNERGISTIC EFFECT ON THE HOSPITAL INFECTION AGENT PSEUDOMONAS AERUGINOSA OF ANTIVIRAL DRUGS</i>	250
Burcu ÜNLÜ ENDİRLİK, Elçin BAKIR, Aysun ÖKÇESİZ, Zuhal HAMURCU, Ayşe EKEN, Aylin GÜRBAY - <b>EVALUATION OF ROUNDUP® TOXICITY IN HUMAN LUNG CELLS</b> - <i>İNSAN AKCİĞER HÜCRELERİNDE ROUNDUP® TOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ</i>	260
Emine Kübra YAZICI, Mütjde ERYILMAZ - <b>INVESTIGATION OF THE MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION OF USED LIPSTICKS AND MASCARAS</b> - <i>KULLANILMIŞ RUJ VE MASKARALARDA MİKROBİYOLOJİK KONTAMİNASYONUNUN ARAŞTIRILMASI</i>	269
Halil BAL, Sulhiye YILDIZ - <b>NASAL CARRIAGE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN PHARMACIST AND PHARMACY PERSONNEL</b> - <i>ECZACI VE ECZANE PERSONELİNDE STAPHYLOCOCCUS AUREUS BURUN TAŞIYICILIĞI</i>	277
<b>Derlemeler / Reviews</b>	
Esra ÖZDEK, Sevtap HAN - <b>BEYİN YAŞLANMASINDA MOLEKÜLER MEKANİZMALAR</b> - <i>MOLECULAR MECHANISMS IN BRAIN AGING</i>	284
Merve BABAÇ, Meliha EKİNCİ, Derya İLEM-ÖZDEMİR - <b>KANSER TANISI VE TEDAVİSİNDE KULLANILAN MONOKLONAL ANTİKORLAR</b> - <i>MONOCLONAL ANTIBODIES USED IN CANCER DIAGNOSIS AND TREATMENT</i>	295