



EJBCS

**Eurasian Journal of
Biological and Chemical Sciences
(Eurasian J. Bio. Chem. Sci.)**

Cilt: 7 Volume: 1 Year: 2024

e-ISSN 2651-5237



EJBCS

Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

Cilt: 7 Volume: 1 Year: 2024

Published Biannually

Corresponding Address

Gaziantep University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Gaziantep, Turkey

E-mail: mtdogan1@gmail.com

Web: <https://www.dergipark.org.tr/ejbc>

Editor in Chief

Prof. Dr. Muhittin DOĞAN

Editor (Associate)

Assoc. Prof. Dr. Muhammet DOĞAN

Editorial Board

Prof. Dr. Ali Tuncay ÖZYILMAZ	Hatay Mustafa Kemal University, Turkey
Prof. Dr. Anna PEKSA	Wrocław University, Poland
Prof. Dr. Elif LOLOĞLU	Gazi University, Turkey
Prof. Dr. Elif ÖZTETİK	Eskisehir Technical University, Turkey
Prof. Dr. Erol ATAY	Hatay Mustafa Kemal University, Turkey
Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL	İnönü University, Turkey
Prof. Dr. Issa SHARİFPOUR	Iranian Fisheries Research Organization, Iran
Prof. Dr. İsmet YILMAZ	İnönü University, Turkey
Prof. Dr. Osman GÜLNAZ	Cukurova University, Turkey
Prof. Dr. Osman Selçuk ALDEMİR	Adnan Menderes University, Turkey
Prof. Dr. Vladimer TSITSISHVILI	Ivane Javakhishvili Tbilisi State University, Georgia
Prof. Dr. Zeliha SELAMOĞLU	Niğde Ömer Halisdemir University, Turkey
Assoc. Prof. Dr. Demet DOĞAN	Gaziantep University, Turkey
Assoc. Prof. Dr. Gökhan NUR	Gaziantep University, Turkey
Assoc. Prof. Dr. H. Ahmet DEVECİ	Gaziantep University, Turkey
Assoc. Prof. Dr. Şenay UĞUR	Niğde Ömer Halisdemir University, Turkey
Assoc. Prof. Dr. Utku AVCI	Recep Tayyip Erdoğan University, Turkey
Assoc. Prof. Dr. Mustafa PEHLİVAN	Gaziantep University, Turkey
Dr. Ardalan PASDARAN	Shiraz University, Iran.
Dr. Eva URGEOVÁ	The University of St. Cyril and Methodius of Trnava, Slovakia

Technical Editor

Assoc. Prof. Dr. Mustafa SEVİNDİK	Osmaniye Korkut Ata University, Turkey
-----------------------------------	--

Owner / Publisher

Muhammet DOĞAN

This journal is peer-reviewed and published twice (June, December) a year.

All responsibility of the articles belongs to the authors.

e-ISSN 2651-5237



EJBCS

Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

Cilt: 7

Volume: 1

Year: 2024

Contents / İçindekiler

Research Articles / Araştırma Makeleleri

Medicinal Plants of Kurna Village (Burdur Province)..... 1 - 4

Veysi Ergül, Neslihan Balpınar, Ümit Kebapçı

Microplastics Biodegradation by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus versicolor* 5-9

Burcu Şimşek Uygun, Semra Malkoç

Steroidall konjugatların *in vitro* biyolojik aktivite ve *in silico* moleküler bağlanma çalışmaları..... 10 - 19

Sevinç İlkar Erdağı

Oleaster Leaf Extract: A Potential Environmentally Friendly Inhibitor for Mild Steel..... 20 - 25

Demet Özkır

Molecular identification of protease producer ORSK-4 strain and determination of optimum enzyme production conditions 26 - 40

Karcan Işık, Ümit Yırtıcı, Belgin Güldeste, Aysun Ergene

Optimization of kanamycin dose for *in vitro* *Camelina sativa* transformation 41 - 45

Zemran Mustafa

Endüstriyel amaçlı kullanılan bazı boyar maddelerin mutajenik etkilerinin *Drosophila* kanat benek testi ile *in vitro* olarak belirlenmesi 46 - 51

Handan UYSAL, Hatice ÇELİK

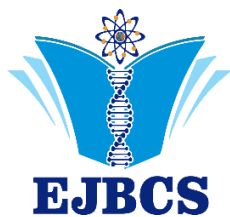
Review Articles / Derleme Makeleleri

Kırmızı pancar (*Beta vulgaris* L.): Besinsel bileşimi, antioksidan özellikleri ve sağlık faydaları.... 52 - 61

Atiye Kaynak, Zehra Nur Başkan, Berna Satış, Muhammet Doğan

Dropsy Syndrome (Tummy Cavity Oedema, Assist) 62 - 65

Nurdan Filik



Medicinal plants of Kurna Village (Burdur province)

Veysi Ergül¹ , Neslihan Balpınar^{2*} , Ümit Kebapçı² 

¹Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Burdur, Türkiye

²Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Science and Arts Faculty, Burdur, Türkiye.

*Corresponding author: nerdogan@mehmetakif.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-4469-8629>

Received : 01/12/2023
Accepted : 25/01/2024

To Cite / Atıf için: Ergül V, Balpınar N, Kebapçı Ü. 2024. Medicinal plants of Kurna Village (Burdur province). Eurasian J Bio Chem Sci, 7(1):1-4
<https://doi.org/10.46239/ejbc.1399029>

Abstract: Plants have been among the primary natural sources used in traditional medicine, both in the past and present. Due to the many advantages they offer compared to the synthetic drugs, the interest in medicinal plants is rapidly increasing not only worldwide but also in our country. This study has been conducted with the aim of identifying natural medicinal plants in the Kurna Village and its surroundings. As a result of fieldwork conducted during the flowering periods of the plants, 40 medicinal plant taxa belonging to 39 genera from 21 families were identified. Family Asteraceae is notable having the highest number of taxa with 7 taxa, followed by Lamiaceae with 5 taxa, families Brassicaceae, Boraginaceae and Fabaceae each with 3 taxa. The scientific names, parts used and areas of use concerning the medicinal plants determined were presented. We hope that the presented data will provide guidance to local people, raise awareness on the floral diversity, add data to relevant literature.

Keywords: Burdur, flora, folk medicine, Mediterranean.

*THIS STUDY WAS PUBLISHED AS AN ABSTRACT PAPER IN 6TH INTERNATIONAL EURASIAN CONFERENCE ON BIOLOGICAL AND CHEMICAL SCIENCES (EURASIANBIOCHEM 2023) HOLD FROM OCTOBER 11 TO 13, 2023, TURKEY

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

Rapid progress in the technology necessitates sustainable use of natural resources. As the side effects of modern drugs are of major concern, natural supplementary and therapeutic plants have been widely used in traditional medicine and commercial field (Başer, 1990). The number of plant based drugs known to be used in medicine has reached 13 000 by early 19th century (Baytop, 1984). Being at the meeting point of various climatic zones and having diverse habitat types, Türkiye is home to a rich flora (Baytop, 1991), which according to Flora of Turkey correspond to approximately 11 700 plant taxa (Davis, 1965-1988; Güner et al., 2000), of which 3 649 being endemics (Güner et al., 2012). As with the other parts of the world, medicinal plants are used frequently in folk medicine in Türkiye even though the number of medicinal plants used (round about 500 species) is fairly low relative to its considerably rich species richness and endemism, also when compared with countries like China (4 941 species), India (3 000 species) and USA (2 564 species) (Bayramoğlu et al., 2009).

The interest on alternative therapy methods and medicinal plants have been brought globally to a further level during

the recent COVID-19 pandemia, and medicinal plants in protective and complementary medicine have acquired another dimension by means of explorative research on phytoactive chemicals strengthening the immune defence system against viral pathogens (Şekeroğlu and Gezici, 2020). However, contrastingly, folk medicine is largely restricted to remote, rural areas with people still in connection with wild plants especially in Türkiye. Primarily the natural plants in Turkish folk medicine are used either as food or for medicinal purposes, while plant dyes and other uses are less common. Some plants with poisonous compounds that may be potentially important for public health and animal welfare are also within the range of interest (Baytop, 1984). Disparity between growing speed of modernization and loss of connection with nature, necessitates gathering of accumulated, but sparse local data using scientific methodology as evidently these would provide more opportunities to obtain raw materials from the natural resources in a sustainable way, and joint platforms of applied sciences like pharmacy or medicine with botany will contribute to the economy, health sciences and nature conservation. Accordingly, this study aims to determine medicinal plant taxa as part of the native flora of Kurna

village area within Burdur province and raise awareness among local people on the issue within context of a rapid urbanization period.

2. Materials and Method

Location of the study area is 8-10 km away from the Burdur city in the SSE direction en route to Antalya, situated in C3 square according to Davis (1965-1985) grid system, and between 30° 20' N and 37° 41' E coordinates. Altitudinal range varies between 1100 and 1300 m., while the climate shows characteristics of semiarid Mediterranean type with an annual precipitation of 426.4 mm and annual temperature of 13.3°C (maximum and minimum monthly averages being 32.2 and -0.9°C, respectively).

Field studies involving collection, labelling and deposition of herbarium materials in Burdur Mehmet Akif Ersoy University Biology Department following standard methodology, were carried out in the flowering season of 2022-2023 period. Identifications were made from family level down to subspecific ranks using primarily Flora of Turkey and the East Aegan Islands (Davis, 1965-1985; Davis et al., 1988; Güner et al., 2000), current taxonomy was checked using Güner et al. (2012).

3. Results

40 vascular plant taxa belonging to 39 genera from 21 different families were identified from the material that had been collected in the different vegetative periods (Table 1). Among the 21 families, leading 5 families with the highest species counts are listed as follows; Asteraceae (7 taxa), Lamiaceae (5 taxa), Brassicaceae, Boraginaceae and Fabaceae (3 taxa).

Table 1 Medicinal plants from the study area, their utilized parts and medicinal uses.

Family	Species	Utilized parts	Medicinal use
Pinaceae	<i>Pinus brutia</i> Ten. var. <i>brutia</i>	Needles stem, pollens	Effective on respiratory, urological, rheumatological, dermatological diseases (6).
Acanthaceae	<i>Acanthus hirsutus</i> Boiss. subsp. <i>hirsutus</i>	Leaves	Wound healing and apophlegmatical (6).
Asteraceae	<i>Centaurea urvillei</i> DC. subsp. <i>stepposa</i> Wagenitz <i>Chondrilla juncea</i> L.	Various parts Roots	Antifungal (8) Effective on stomach pain; wound healing (6).
	<i>Cnicus benedictus</i> L.	Roots, stem	Effective on liver and gastrointestinal problems;
Boraginaceae	<i>Alkanna tinctoria</i> (L.) Tausch subsp. <i>tinctoria</i>	Roots	Laxative and wound healing (6), applied as ointment (14).
Brassicaceae	<i>Echium vulgare</i> L. subsp. <i>vulgare</i> <i>Moltkia aurea</i> Boiss. <i>Arabis alpina</i> L. subsp. <i>brevifolia</i> (DC.) Cullen	Flowers, stem, leaves Flowers, leaves Flowers, stem, leaves	Urinative and apophlegmatical (6). Antioxidant and antimicrobial (4). Antioxidant and antimicrobial (3).
Caprifoliaceae	<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medik. <i>Diploaxis tenuifolia</i> (L.) DC. <i>Scabiosa columbaria</i> L. subsp. <i>ochroleuca</i> (L.) Čélak. var. <i>ochroleuca</i>	Flowers, stem, leaves Flowers	Urinative and antifungal (9). Laxative, urinate, wound healing (6).
Caryophyllaceae	<i>Dianthus calocephal</i>	Flowers	Antimicrobial (1).
	<i>Cota tinctoria</i> (L.) J.Gay ex Guss. var. <i>tinctoria</i>	All parts	antipyretic, appetising, antidiarrheal, urinate, cell regenerative, wound healing (7). Diaphoretic, emetic, antispasmodic (6).
	<i>Lactuca serriola</i> L.	Flowers, stem, extract	Urinative, antispasmodic and sedative (poisonous when overused) (6). Effective on dyspnea (12); antioxidant and antimicrobial (5).
	<i>Senecio vernalis</i> Waldst.& Kit.	Flowers, leaves	Effective on arteriosclerosis, hypertension, rheumatism, kidney diseases; tubers laxative and emetic (6), antifungal (2).
	<i>Scorzonera suberosa</i> K.Koch subsp. <i>suberosa</i>	Various parts	Effective on arteriosclerosis, hypertension, rheumatism, kidney diseases; tubers laxative and emetic (6), antifungal (2).

	<i>us</i> Boiss.						and inflammations in respiratory and gastrointestinal tract (6).
	<i>Stellaria media</i> (L.) Vill.	Flowers stem, leaves	Urinative, apophlegmatical, wound healing (6), and antioxidant (16).		<i>Malva sylvestris</i> L.	Leaves, fresh stems	Softener, protective against ulcers and inflammations in respiratory and gastrointestinal tract (6).
Convolvulaceae	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	Roots, flowers, stem, leaves, extract	Laxative, billigenic, anthelmintic (6), antimicrobial (11)				and inflammations in respiratory and gastrointestinal tract (6).
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia rigida</i> M. Bieb.	Extract	Laxative, external use Effective on warts and rheumatismal pain (6)	Papaveraceae	<i>Papaver rhoeas</i> L.	Flowers, fruits, leaves	Sedative, cough suppressant, chest softener, and mildly opiate (6).
Fabaceae	<i>Lotus corniculatus</i> L. var. <i>tenuifolius</i>	Various parts	Sedative (6).	Plantaginaceae	<i>Plantago lanceolata</i> L.	Leaves	Effective on constipation; chest softener, apophlegmatical and urinate;
	<i>Ononis spinosa</i> L. subsp. <i>antiquorum</i> (L.) Briq.	Roots	Effective on egzema; urinate, antiseptic and wound healing (6).				externally wound healing and used for suppuration (6).
	<i>Trifolium pratense</i> L. var. <i>pratense</i>	Flowers	Apophlegmatical and antiseptic (6;13).	Polygonaceae	<i>Polygala pruinosa</i> Boiss. subsp. <i>pruinosa</i>	Flowers, fruits, leaves	Emetive, apophlegmatical chest softener, galactagogue, diaphoretic and tonic (6).
Fagaceae	<i>Quercus coccifera</i> L.	Acorns	Effective on throat problems; laxative, tonic and antiseptic (6).	Ranunculaceae	<i>Ranunculus sceleratus</i> L.	Various parts	Galactagogue and emmenagogue, externally poisonous and caustic (6).
Lamiaceae	<i>Ajuga chamaepitys</i> (L.) Schreb subsp. <i>mesogitana</i> (Boiss.) Bornm.	Leaves, stem	Urinative, tonic, diaphoretic, emmenagogue, wound healing and antidotal (6).	Rosaceae	<i>Prunus x domestica</i> L. <i>Rosa canina</i> L.	Fruits	Nutritious and mildly laxative (6). Effective on constipation and diabetes mellitus; tonic (6).
	<i>Ballota nigra</i> L. subsp. <i>anatolica</i> P.H. Davis	Flowers, leaves, stem	Urinative, digestive, anthelmintic, emmenagogue (6).	Solanaceae	<i>Datura stramonium</i> L.	Leaves	Effective on asthma, cough and cramps; antispasmodic, poisonous and narcotic (6).
	<i>Lamium maculatum</i> L. var. <i>maculatum</i>	Leaves, stem, flowers	Laxative and tonic (6).	Asparagaceae	<i>Muscari neglectum</i> Guss. Ex. Ten	All parts	Effective on skin problems (10).
	<i>Salvia cadmica</i> Boiss. var. <i>cadmica</i>	Various parts	Astringent (15).	Poaceae	<i>Secale cereale</i> L. var. <i>cereale</i>	Seeds	Laxative (6).
	<i>Sideritis montana</i> L. subsp. <i>remota</i> (d'Urv.) P.W.Ball	Flowers, leaves	Effective on cold, flu, stomach pain and cough (17); gas and appetite-stimulant (6).				
Malvaceae	<i>Malva neglecta</i> Wallr.	Leaves, stem	Softener, protective against ulcers				

1) Abbasolu and Türköz, 1995; 2) Bahadır, 2009; 3) Balpınar, 2018; 4) Balpınar and Okmen, 2017; 5) Balpınar and Okmen, 2019; 6) Baytop, 1984; 7) Dülger, 2012; 8) Erecevit Sönmez and Çakılcıoğlu, 2021; 9) Erik, 2012; 10) Fidan, 2018; 11) Kırbacı et al., 2005; 12) Korkmaz and Alpaslan, 2014; 13) Leblebici et al. 2013; 14) Ötnü and Akan, 2020; 15) Özdemir and Alpınar, 2015; 16) Rakhimzhanova et al., 2018; 17) Yılmaz, 2013.

4. Discussion

Literature review suggests a diverse array of medicinal uses, some of which have recently been assessed (Balpınar, 2018, Balpınar and Okmen, 2017 and 2019) from the area, even though majority of the species and their uses have been recorded earlier (Baytop, 1984). Several factors such as used parts, usage style, collecting time, and dosage are important criteria in all other plant based remedies, as it applies to our small sample. Some of the recorded taxa like *Lactuca serriola*, *Scorzonera suberosa* subsp. *suberosa*, *Ranunculus sceleratus*, and *Datura stramonium* should be handled with care as overdose levels of these may be poisonous for humans.

5. Conclusion

In the present study, medicinal plants of a village at the periphery of an expanding city center were studied. Even though a smaller part of the sampled plant taxa is known to local people, and such taxa receive wider application area outside scope of medicinal purposes, identification skills are not precise in general even though all the taxa are grown naturally in and around the settlement area. Accordingly, although it is a preliminary work, the presented data will raise awareness and guidance about the potential of the local flora. The current state of knowledge present two challenges: first is the correct identification, usage and amount of utilized taxa, while the other being the survival of populations especially when the rare and endemic plants are involved as the public interest may be directed towards a smaller set of taxa or associated areas. It is clear that the ethnobotanical applications are multifaceted and require interdisciplinary research, to which it is hoped that the presented data will provide a base or background information for the science community and local administrative units in the view of rapidly changing landscape.

Acknowledgements

This study was partially supported by Burdur Mehmet Akif Ersoy University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: 0235-MP-14).

Authors' contributions: VE: Field study and identification; NB: Supervision and identification; ÜK: English text, formatting and discussion.

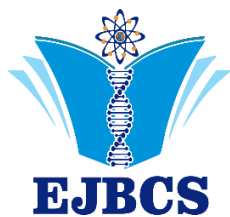
Conflict of interest disclosure:

No conflict of interest is declared by the authors.

References

Abbasolu U, Türköz S. 1995. Antimicrobial activities of saponin extracts from some indigenous plants of Turkey. *Int J Pharmacogn.* 33(4):293-296.
Bahadır Ö. 2009. Türkiye'de yetişen bazı *Scorzonera* türleri üzerinde farmakognozik araştırmalar. A.Ü. Eczacılık Fakültesi, PhD Thesis

Balpınar, N. 2018. The biological activities of *Arabis alpina* L. subsp. *brevifolia* (DC.) Cullen against food pathogens. *Open Chemistry.* 16 (1):930-936
Balpınar N, Okmen G. 2017. The biological activities of *Moltkia aurea* Boiss., an endemic species to Turkey. *Afr. J. Tradit Complement Altern Med.* 14(2):60-64.
Balpınar N, Okmen G. 2019. Biological activities and chemical composition of *Senecio vernalis* growing in the lakes region of Turkey. *IJEST,* 16(9):5205-5212
Başer HC. 1990. Tıbbi bitki ve baharatların Dünya'da ve Türkiye'deki ticareti ve talep durumu. *Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Dergisi.* 53:18-22
Bayramoğlu MM, Toksoy D, Şen G. 2009. Türkiye'de Tıbbi Bitki Ticareti II. Ormanlıkta Sosyo-Ekonomik Sorunlar Kongresi, s. 89-98, 19-21 Şubat, Isparta
Baytop T. 1984. Türkiye'de bitkiler ile tedavi (Geçmişte ve bugün). İstanbul Üniversitesi Yayınları
Baytop A. 1991. Tıbbi bitkilerimizin yerli adları hakkında. *Ziraat Mühendisliği.* 239: 25-26
Davis PH. 1965-1985. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 1-9. Edinburg: University Press
Davis PH, Tan K, Mill RR. 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 10. Edinburg: University Press
Dülger D. 2012. *Cnicus benedictus*'un besleyici ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi. Uludağ University, PhD Thesis
Erecevit Sönmez P, Çakılcıoğlu U. 2021. Türkiye'de yetişen *Centaurea urvillei* DC. subsp. *urvillei*' nin antibakteriyel ve antifungal özelliği. *Int J Pure Appl Sci,* 7 (3):517-525. doi: 10.29132/ijpas.988385
Erik S. 2012. Çok yönlü ruderal bir tür: *Diplotaxis tenuifolia* (L) DC. Ankara Üniversitesi Çevre Bilimleri Dergisi. 4 (1):27-36. doi: 10.1501/Csaum_0000000060
Fidan EŞ. 2018. An ethnobotanical study in some villages in the Tek Tek mountains, Harran University, PhD Thesis
Güner A., Özhatay N, Ekim T, Başer K. 2000. Flora of Turkey and the East Aegean Islands 11. Edinburgh Univ. Press
Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç MT. 2012. Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler): Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayınları
Kırbağ S, Kurşat M, Kırbağ Zengin F. 2005. Elazığ'da tıbbi amaçlar için kullanılan bazı bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri. *Fırat Üniversitesi Doğu Araştırmaları Dergisi,* 3(3):168-171
Korkmaz M, Alpaslan Z. 2014. Ergen Dağı Erzincan-Türkiye'nin etnobotanik özellikleri. *Bağbahçe Bilim Dergisi,* 1 (3):1-31
Leblebici S, Bingöl AN, Akın B. 2013. Halk Arasında Kullanılan Bazı Sulak Alan Bitkileri ve Tıbbi Özellikleri. III. Sulak Alanlar Kongresi, 23-25 Ekim, 331-336. sayfa, Samsun
Ötün H, Akan H. 2020. Şanlıurfa'daki eczanelerde ve aktarlarda fitoterapi amaçlı satılan bitkiler. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi,* 23(4):947-965
Özdemir E, Alpınar K. 2015. An ethnobotanical survey of medicinal plants in western part of central Taurus Mountains: Aladağlar (Niğde-Turkey). *J Ethnopharmacol,* 166:53-65
Rakhimzhanova A, Kılınçarslan Ö, Mammadov R. 2018. *Stellaria media* ekstraktlarının antioksidan aktivitesinin belirlenmesi ve fenolik bileşenlerinin karakterizasyonu. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi,* 8(2):165-173
Şekeroğlu N, Gezici S. 2020. Koronavirüs pandemisi ve Türkiye'nin bazı şifalı bitkileri. *Anadolu Kliniği Tıp Bilimleri Dergisi.* 25 (Special Issue on COVID 19):163-182
Yılmaz E. 2013. Toroslar da yetişen 7 endemik *Sideritis* türünün fenolik maddeleri. G. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. PhD Thesis



Microplastics Biodegradation by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus versicolor*

Burcu Şimşek Uygun¹, Semra Malkoç^{1,2*}

¹Eskişehir Technical University, Faculty of Engineering, Department of Environmental Engineering, Eskişehir, Turkey

²Eskişehir Technical University, Environmental Research Center (ÇEVMER), Eskişehir, Turkey

*Corresponding author: satik@eskisehir.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-8092-411X>

Received : 12/10/2023
Accepted : 16/02/2024

To Cite / Atf için: Şimşek Uygun B, Malkoç S. 2024. Microplastics Biodegradation by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus versicolor*. Eurasian J Bio Chem Sci, 7(1):5-9 <https://doi.org/10.46239/ejbc.1374947>

Abstract: Microplastics (MPs) have indeed raised significant concerns due to their widespread presence and potential adverse effects on both the environment and human health. This study aims to illuminate crucial aspects of MPs, including their origins, migration behavior, and the potential for bioremediation as an effective strategy for their removal. Microplastics can originate from various sources, such as the fragmentation of larger plastics, the presence of microbeads in personal care products, the shedding of fibers from textiles, industrial pellets, and products containing microplastics. These diverse sources contribute to the omnipresence of microplastics in both terrestrial and aquatic ecosystems. This study focuses on observing the biological degradation process of two fungi, *Aspergillus flavus*, and *Aspergillus versicolor* when exposed to three different types of microplastics: Polypropylene (PP), Polyethylene (PE), and Polystyrene (PS). After conducting experiments, removal efficiencies of *A. flavus* and *A. versicolor* were calculated. Based on the data collected during the 10th week of using these fungi, it was observed that *A. flavus* exhibited removal efficiencies of 18.3% for PE, 6.8% for PP, and 1.9% for PS. On the other hand, *A. versicolor* yielded removal efficiencies of 6.7% for PE, 5.1% for PP, and 3.3% for PS. It was determined that *A. flavus* and *A. versicolor* exhibited the highest biodegradation efficiency when targeting microplastic PE, while their effectiveness was relatively lower when dealing with microplastic PS.

Keywords: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor*, Biodegradation, Polyethylene, Polystyrene, Polypropylene.

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

The issue of microplastic (MPs) pollution in aquatic environments has garnered significant attention in recent years due to its detrimental effects on ecosystems and potential implications for human health (Katija et al. 2017; Weithmann et al. 2018). MPs, typically defined as plastic particles with a diameter of less than 5 mm, are of particular concern because of their widespread presence and persistence in the environment (Alimi et al. 2018; Hidalgo-Ruz et al. 2012; Murphy et al. 2016). MPs can be categorized into two main types: primary and secondary. Primary microplastics are intentionally manufactured at small sizes for various purposes, such as microbeads in cosmetic products, while secondary microplastics are formed through the degradation of larger plastic items via physical, chemical, or biological processes (Browne et al. 2010; Gewert et al. 2015; Singh and Sharma, 2008). The scale of plastic pollution in oceans is alarming, with an estimated 150 million tons of plastic already present and approximately 8 million tons being added annually. This

continuous influx exacerbates the environmental and ecological challenges associated with plastic pollution (Zhang et al. 2020a).

Among the various types of plastics, polyethylene (PE) and polypropylene (PP) are reported to have the highest demand globally. These plastics are commonly used in a wide range of applications due to their versatility, durability, and low cost. However, their persistence in the environment poses significant challenges for waste management and pollution control efforts. In contrast to PE and PP, other types of plastics such as polystyrene (PS), polyvinyl chloride (PVC), polyethylene terephthalate (PET), and polyurethane (PU) also contribute to plastic pollution but may exhibit different degradation behaviors and environmental impacts. Understanding the sources, distribution, and effects of various types of plastics is crucial for developing effective mitigation strategies and policies to address this pressing environmental issue (Browne et al. 2010; Weinstein et al. 2016; Zhang et al. 2020a).

The degradation of MPs in different environments is a complex process influenced by various physicochemical and microbial factors. Although MPs are generally less susceptible to microbial attack compared to other degradable materials, microbial degradation plays a significant role in their transformation (Ammala et al. 2011).

Microbial degradation of MPs occurs through the activity of microorganisms that colonize and utilize MPs as a carbon source. These microorganisms form a novel ecological niche on the surface of MPs, facilitating their degradation. Researchers have isolated various types of microbes from different environmental samples to investigate their role in MP degradation. These microorganisms can be categorized into pure bacterial cultures, pure fungal cultures, bacterial consortia, and biofilms (Rujnic-Sokele and Pilipovic, 2017). Overall, understanding the diversity and activity of microorganisms involved in MP degradation is essential for developing strategies to mitigate plastic pollution. Harnessing the potential of microbial degradation pathways may offer promising solutions for managing MP contamination in various environments (Yuan et al. 2020). Fungi, being eukaryotic organisms with a nucleus enclosed by a nuclear membrane, have a distinct advantage over prokaryotes in terms of genetic organization and regulation. This characteristic allows for more complex and precise control of cellular functions, potentially aiding in the efficient degradation of MPs (Sanchez, 2020). Laccase, an important enzyme produced by fungi, in the degradation of microplastics (MPs). Laccase indeed plays a crucial role in breaking down certain types of plastics like HDPE (high-density polyethylene) through oxidative cleavage, enabling the degradation process (Othman et al. 2021).

Fungal species, such as *Zalerion maritimum*, *Aspergillus niger*, and *Aspergillus fumigatus*, have demonstrated the ability to degrade MPs and utilize them as a sole carbon source. *Aspergillus* sp. demonstrates the ability to degrade polyurethane, which is a widely used synthetic polymer. The observed 20% degradation within 28 days highlights the effectiveness of this fungal species in breaking down polyurethane (PU) (Osman et al. 2017). Fungal MP degradation was demonstrated by Osahon and Williams (2021) using isolated fungi from a river. *A. niger* achieved a degradation rate of 71.1% for PP-MPs under the given conditions (1 g/L NaCl and ambient temperature) within 90 days. *A. fumigatus* exhibited a degradation rate of 53.1% for PP-MPs under the same conditions over the same 90-day duration. Adding carbon sources such as glucose and malt extract to the growth medium can significantly enhance the enzyme activity of the marine fungus *Zalerion maritimum*. These carbon sources likely provide the necessary nutrients and energy for the fungi to produce enzymes capable of breaking down polyethylene microplastics. The use of optimized growth conditions, including the pre-incubation process, led to a removal efficiency of 56% (Paco et al. 2017).

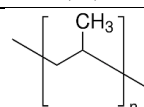
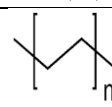
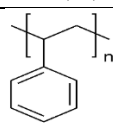
This study aims to investigate whether *A. versicolor* and *A. flavus* can degrade PP, PS, and PE by using the measurement of dry weight. The investigation will help to discover the role of the selected fungal species in degrading

different types of MPs in the environment and to determine new approaches for their degradation.

2. Materials and Method

PP, PS, and PE were used as microplastics. PP, PS, and PE granules were obtained from Sigma Aldrich Chemical Co. (Product of USA) with densities of 0.9, 0.918, and 1.04 g/mL at 25°C, respectively. The granules were spherical in shape and white in color. The sizes of microplastics used in the study are PP and PE 5 mm, PS 3 mm. Some other properties are given in Table 1.

Table 1. Types and properties of used microplastics

	(PP)	(PE)	(PS)
Structure formula			
T _m (°C) ^a	160-165	100-125	95
Melt index	4.0 g/10 min (230 °C/2.16kg)	1.0 g/10 min (230 °C/2.16kg)	2.0-4.0 g/10 min (200 °C/5 kg)
Form	beads	pellets	pellets

^aT_m, melting temperature.

MPs were steeped in 70% ethanol for sterilization at room temperature for 24 hours. Subsequently, they were transferred from the conical flasks into sterile beakers using sterile forceps. Approximately 0.5 grams of each microplastic type was weighed and placed in petri dishes. The microplastics in the petri dishes were left to stand under UV light for 24 hours.

A. flavus and *A. versicolor* were obtained from the Environmental Microbiology Laboratory, Eskişehir Technical University, Turkey. Fungi were cultivated in Potato Dextrose Agar (PDA) media, incubated at 28°C with a pH of 7 for 7 days.

The mineral salts medium (MSM) used for the biodegradation experiment contained the following composition in gram per liter (g/l): MgSO₄.7H₂O, 0.02 g; FeSO₄.7H₂O, 0.01 g; ZnSO₄.7H₂O, 0.001 g; MnSO₄.H₂O, 0.001 g; CuSO₄.5H₂O, 0.001 g; (NH₄)₂SO₄, 0.2g; KCl, 0.15g; CaCl₂.2H₂O, 0.002 g; NaCl, 0.15g; CoCl₂.6H₂O 0.001 g; and KH₂PO₄ 0.001 g; which was prepared by dissolving the salts in distilled water. The medium was sterilized by autoclaving at 121°C for 20 minutes. In a 100 mL conical flask, 50 mL of MSM was taken along with MPs positive (mineral salt media + MPs + fungus) and negative (mineral salt media + MPS) controls, respectively. The flasks were then preserved in a shaking incubator at a shaking rate of 100 rpm.

After exposing fungal isolates for five, seven, and ten weeks at 28°C MPs pieces were harvested, washed in 70% ethanol to remove as much biomass as possible, dried at 45°C, and equilibrated and weights were determined with each of the MPs pieces with and without treatment.

The weight reduction was determined after the degradation by using Eq. (1),

$$\% \text{ weight loss} = \frac{(M_i - M_f)}{M_i} \times 100 \quad (1)$$

where M_i is the initial weight of MPs and M_f is the weight of MPs after the incubation period.

3. Results

Fungal degradation of MPs was assessed over various durations, specifically five, seven, and ten weeks, utilizing *Aspergillus versicolor* and *Aspergillus flavus*. Physical modifications and degradation rate of MPS after fungal degradation were determined by mean weight loss. The results obtained from the fungal degradation of MPs pieces by *A. versicolor*, and *A. flavus*, are as shown in Figures 1 and 2.

Biodegradation efficiencies observed for *Aspergillus versicolor* and *Aspergillus flavus* on different types of plastic pieces for various durations:

For PS; *A. versicolor* has efficiencies of 1.8% (5 weeks), 2.118% (7 weeks), 3.3% (10 weeks), and *A. flavus* has; 0.2% (5 weeks), 0.3% (7 weeks), 1.9% (10 weeks). For PP; *A. versicolor* has efficiencies of 4.2% (5 weeks), 4.5% (7 weeks), and 5.1% (10 weeks); *A. flavus* has 3.0% (5 weeks), 3.7% (7 weeks), 6.8% (10 weeks). For PE; *A. versicolor* has efficiencies of 4.9% (5 weeks), 5.1% (7 weeks), 6.7% (10 weeks), and *A. flavus* has 10.1% (5 weeks), 12.1% (7 weeks), 18.3% (10 weeks). These results show the biodegradation efficiencies achieved by each fungus on different plastic types over different periods.

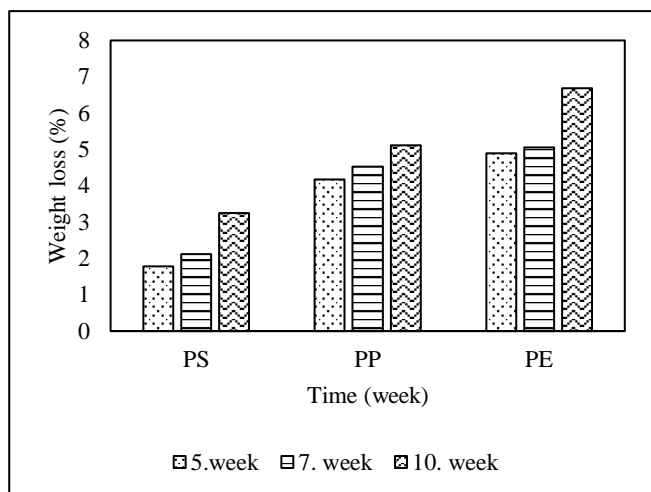


Fig. 1 Fungal biodegradation of MPs pieces of *A. versicolor*

4. Discussion

A. flavus reduced the weight of the PE strip up to 3.9% after 28 days of incubation (Zhang et al. 2020b). Taghavi et al. (2021) observed maximum weight loss was measured by incubation of PE with *Aspergillus flavus* (5.5%) in an unstimulated mix condition. Biodegradation of disposable PE using *Aspergillus* species was carried out by Singh et al. (2012). The strongest ability was observed by *A. terreus* with 7.6% biodegradability followed by *A. versicolor* with 3.8% of biodegradability.

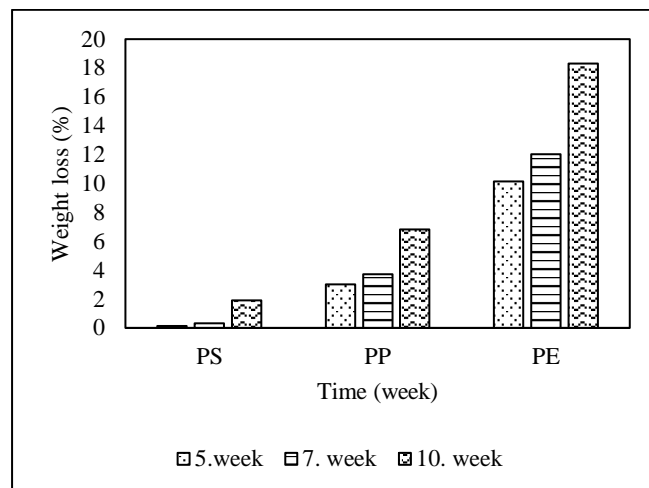


Fig. 2 Fungal biodegradation of MPs pieces of *A. flavus*

Williams and Osahon (2021) studied the PE degradation ability of *Aspergillus niger*, and *Aspergillus fumigatus* after the exposure for 45 days. They observed that the degradation potential of *Aspergillus niger* (71.1%) was more when compared to the *Aspergillus fumigatus* (53.1). *Aspergillus* consortium showed the highest percentage of reduction of PE weight with (26.2%) (Dsouza et al. 2021). Four species of fungi *Aspergillus* sp. were isolated by Alshehrei (2017). PE degradation ability of *A. flavus* 16.2%, *A. niger* 19.5%, *A. terreus* 21.8%, and *A. fumigatus* 20.5% were weighted.

Compared to the literature information, it has been determined that *A. versicolor* and *A. flavus* are effective in the biodegradation of PP, PE, and PS microplastics (Table 2). In particular, *A. flavus* showed the highest percentage of reduction of PE weight with (18.8%).

It has been observed in studies relying on literature data that the efficiency of degradation can vary depending on the fungal species used and the type of microplastic. Different fungal species and types of microplastics may exhibit various enzymatic activities and substrate properties, leading to varying degrees of degradation or biodegradation by different fungal species.

For example, certain fungal species may be more effective on specific plastic polymers, while others may excel in degrading different types of plastics. Additionally, the enzymatic activities and adaptation capabilities of fungi can contribute to the degradation of microplastics to varying degrees under different environmental conditions and parameters.

Therefore, studies related to microplastic biodegradation often test various combinations to evaluate the varying efficiencies between different fungal species and types of microplastics. The results of these studies play an important role in determining which fungal species can effectively degrade which types of microplastics.

In research related to microplastic biodegradation, it is important to assess the effects of fungal species and microplastic types on efficiency. This information can contribute to the development of more effective biological methods and help reduce plastic pollution.

Table 2. Characteristics of biodegradation of microplastics

Strain	MP	I.T., day	W.L., %	T., °C	References
<i>A. flavus</i>	PE	28	3.9	28	(Zhang et al. 2020b)
<i>A. flavus</i>	PE	100	5.5	30	(Taghavi et al. 2021)
<i>A. terreus</i>	PE	30	7.6	28	(Singh et al. 2012)
<i>A. versicolor</i>	PE	30	3.8	28	(Singh et al. 2012)
<i>A. niger</i>	PE	45	71.1	28	(Williams and Osahon, 2021)
<i>A. fumigatus</i>	PE	45	53.1	28	(Williams and Osahon, 2021)
<i>A. consortium</i>	PE	55	26.2	28	(Dsouza et al. 2021)
<i>A. flavus</i>	PE	30	16.2	28	(Alshehrei, 2017)
<i>A. niger</i>	PE	30	19.5	28	(Alshehrei, 2017)
<i>A. terreus</i>	PE	30	21.8	28	(Alshehrei, 2017)
<i>A. fumigatus</i>	PE	30	20.5	28	(Alshehrei, 2017)
<i>A. versicolor</i>	PS	70	3.3	28	Our study
<i>A. versicolor</i>	PP	70	5.1	28	Our study
<i>A. versicolor</i>	PE	70	6.7	28	Our study
<i>A. flavus</i>	PS	70	1.9	28	Our study
<i>A. flavus</i>	PP	70	6.8	28	Our study
<i>A. flavus</i>	PE	70	18.8	28	Our study

I.T.: Incubation Time

W.L.: Weight loss

T: Temperature

5. Conclusion

The pervasive use of plastic has become a defining aspect of modern life, finding applications across various sectors owing to its durability and easy availability. However, this widespread plastic consumption has given rise to a notable surge in plastic pollution. Plastics have become an integral part of our daily lives, thanks to their resilient nature and widespread availability. Unfortunately, this extensive use has resulted in a considerable upswing in plastic pollution, with microplastics emerging as a critical environmental concern. Due to the chemical composition of microplastics, their biological removal is quite challenging. Microplastic pollution poses substantial harm to living organisms, the environment, and ecosystems.

In this study, the biodegradation of PP, PS, and PE microplastics by *A. versicolor* and *A. flavus* was observed. Biodegradation efficiencies were calculated at the end of a 5, 7, and 10-week incubation period at 28°C.

For PS; *A. versicolor* has efficiencies of 1.8% (5 weeks), 2.118% (7 weeks), 3.3% (10 weeks), and *A. flavus* has; 0.2% (5 weeks), 0.3% (7 weeks), 1.9% (10 weeks). For PP; *A. versicolor* has efficiencies of 4.2% (5 weeks), 4.5% (7 weeks), and 5.1% (10 weeks); *A. flavus* has 3.0% (5 weeks), 3.7% (7 weeks), 6.8% (10 weeks). For PE; *A. versicolor* has efficiencies of 4.9% (5 weeks), 5.1% (7 weeks), 6.7% (10 weeks), and *A. flavus* has 10.1% (5 weeks), 12.1% (7 weeks), 18.3% (10 weeks).

It appears that all results demonstrate a significant level of microbial activity in the degradation and breakdown of PE pieces. Additionally, these results indicate that the rate of degradation of PE pieces is dependent on the duration of microbial activity.

Acknowledgments

This work was financially supported by the Unit of the Scientific Research Projects of Eskişehir Technical University under grant no. [22ADP090].

Authors' contributions: SM: obtaining data, editing, and writing; BSU, editing and writing.

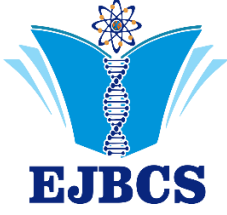
Conflict of interest disclosure:

The authors declare that there were no conflicts of interest in the realization of this research.

References

- Alimi O, Farner Budarz J, Hernandez LM, Tufenkji N. 2018. Microplastics and nanoplastics in aquatic environments: aggregation, deposition, and enhanced contaminant transport. *Environ Sci Technol.* 52: 1704e1724.
- Alshehrei F. 2017. Biodegradation of low density polyethylene by fungi isolated from Red sea water. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 6(8): 1703-1709.
- Ammala A, Bateman S, Dean K, Petinakis E, Sangwan P, Wong S, Yuan Q, Yu L, Patrick C, Leong KH. 2011. An overview of degradable and biodegradable polyolefins. *Prog Polym Sci.* 36: 1015–1049.
- Browne MA, Crump P, Niven SJ, Teuten E, Tonkin A, Galloway T, Thompson, R, 2011. Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks. *Environ Sci Technol.* 45: 9175e9179.
- DSouza GC, Sheriff RS, Ullanat V, Shrikrishna A, Joshi AV, Hiremath L, Entoori K. 2021. Fungal biodegradation of low-density polyethylene using consortium of *Aspergillus* species under controlled conditions. *Heliyon.* 7(5): e07008.
- Gewert B, Plassmann MM, MacLeod M. 2015. Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environ Sci Process Impacts.* 17: 1513e1521.
- Hidalgo-Ruz V, Gutow L, Thompson RC, Thiel M. 2012. Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environ Sci Technol.* 46: 3060e3075.
- Katija K, Choy CA, Sherlock RE, Sherman AD, Robison BH. 2017. From the surface to the seafloor: how giant larvaceans transport microplastics into the deep sea. *J Sci Adv.* 3: e1700715.
- Murphy F, Ewins C, Carbonnier F, Quinn B. 2016. Wastewater treatment Works (WwTW) as a source of microplastics in the aquatic environment. *Environ Sci Technol.* 50: 5800e5808.
- Osahon NT, Williams JO. 2021. Assessment of microplastic degrading potential of fungal isolates from an estuary in rivers state, Nigeria. *South Asian J Res Microbiol.* 9 (2): 11–19.
- Osman M, Satti SM, Luqman A, Hasan F, Shah Z, Shah AA. 2017. Degradation of polyester polyurethane by *Aspergillus* sp. strain S45 isolated from soil. *J Polym Environ.* 26:301–310.
- Othman AR, Hasan HA, Muhamad MH, Ismail NI, Abdullah SRS. 2021. Microbial degradation of microplastics by enzymatic processes: a review. *Environ Chem Lett.* 19 (4): 3057–3073.
- Paco A, Duarte K, da Costa JP, Santos PSM, Pereira R, Pereira ME, Freitas AC, Duarte AC, Rocha-Santos TAP. 2017. Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*. *Sci Total Environ.* 586: 10–15.

- Rujnic-Sokele M, Pilipovic A. 2017. Challenges and opportunities of biodegradable plastics: a mini-review. *Waste Manag Res.* 35:132–140.
- S´anchez C. 2020. Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: an overview of macro- and microplastics biodegradation. *Biotechnol Adv.* 40: 107501.
- Singh B, Sharma N. 2008. Mechanistic implications of plastic degradation. *Polym Degrad Stab.* 93: 561e584.
- Singh V, Dubey M, Bhadauria S. 2012. Biodeterioration of polyethylene high density by *Aspergillus versicolor* and *Aspergillus terreus*. *J Adv Lab Res Biol.* 3(1): 47-49.
- Taghavi N, Singhal N, Zhuang WQ, Baroutian S. 2021. Degradation of plastic waste using stimulated and naturally occurring microbial strains. *Chemosphere.* 263: 127975.
- Weithmann N, M€oller JN, L€oder MGJ, Piehl S, Laforsch C, Freitag R. 2018. Organic fertilizer as a vehicle for the entry of microplastic into the environment. *Sci Adv.* 4: eaap8060.
- Weinstein JE, Crocker BK, Gray AD. 2016. From macroplastic to microplastic: degradation of high-density polyethylene, polypropylene, and polystyrene in a salt marsh habitat. *Environ Toxicol Chem.* 35: 1632e1640.
- Williams JO, Osahon NT. 2021. Assessment of microplastic degrading potential of fungal isolates from an Estuary in Rivers State, Nigeria. *South Asian J Res Microbiol.* 9(2):11-19.
- Yuan J, Ma J, Sun Y, Zhou T, Zhao Y, Yu F. 2020. Microbial degradation and other environmental aspects of microplastics/ plastics. *Sci Total Environ.* 715: 136968.
- Zhang W, Zhang L, Hua T, Li Y, Zhou X, Wang W, You Z, Wang H, Li M. 2020b. The mechanism for adsorption of Cr(VI) ions by PE microplastics in ternary system of natural water environment. *Environ Pollut.* 257: 113440.
- Zhang J, Gao D, Li Q, Zhao Y, Li L, Lin H, Bi Q, Zhao Y. 2020b. Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*. *Sci Total Environ.* 704: 135931.



Steroidall konjugatların *in vitro* biyolojik aktivite ve *in silico* moleküler bağlanma çalışmaları

Sevinç İlkar Erdağı^{1*} 

¹Kocaeli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Kocaeli, Türkiye

*Corresponding author: sevinc.ilkar@kocaeli.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0001-5811-2302>

Received : 12/01/2024
Accepted : 25/02/2024

To Cite / Atf için: İlkar Erdağı S. 2024. Steroidal konjugatların *in vitro* biyolojik aktivite ve *in silico* moleküler bağlanma çalışmaları. Eurasian J Bio Chem Sci, 7(1):10-19 <https://doi.org/10.46239/ejbcs.1418794>

Özet: Steroidal bileşikler, hormon reseptörleri ve steroidojenik enzimler için ligandlar veya substratlar olarak görev yaparlar. Bu bileşikler, hücre büyümesi ve çoğalma gibi birçok biyolojik süreçte etkili rol oynarlar. Daha önce yapılan çalışmalar steroid bileşiklerinin kanser hücrelerini hedefleme ve kanser tedavisinde kullanma potansiyelini göstermektedir. Steroid bileşiklerinin biyolojik olarak aktif 4-metil-7-hidroksi kumarin bileşiği ile konjuge edilerek yeni konjugatlar geliştirildiği daha önceki çalışmada bildirildi. Bu çalışmada ise, steroidal konjugatların hormona duyarlı ve diğer kanser hücre hatları üzerinde farmakolojik özellikleri incelendi ve *in vitro* olarak değerlendirildi. Seçicilik indeksinin belirlenmesi amacıyla sağlıklı hücre hattına karşı proliferasyonları *in vitro* olarak test edildi. Ayrıca, bu çalışmada ilk olarak, etkin konjugatlar üzerinde protein-ligand etkileşimleri, bağlanma ilgilerini belirlemek amacıyla *in silico* moleküler bağlanma çalışmaları yapıldı. Bu çalışmanın sonuçları, steroid temelli konjugatların çeşitli hastalıkların tedavisine çok yönlü bir yaklaşım sunma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Antiproliferatif aktivite, Biyokonjugat, 4-metil-7-hidroksi kumarin, Moleküler bağlanma, Steroid.

In vitro biological activity and in silico molecular binding studies of steroidal conjugates

Abstract: Steroidal compounds effectively participate in various biological activities, including cellular growth and proliferation, by functioning as ligands or substrates for hormone receptors and steroidogenic enzymes. Previous studies have shown the potential of steroid conjugates in targeting cancer cells and their use in cancer treatment. The previous study reported that new conjugates were developed by conjugating steroid compounds with the biologically active 4-methyl-7-hydroxycoumarin compound. In this study, the pharmacological properties of steroidal conjugates were examined and evaluated *in vitro* on hormone-sensitive and other cancer cell lines. The proliferation against a healthy cell line was tested *in vitro* to determine the selectivity index. Additionally, *in silico* molecular docking studies were conducted for the first time in this study to determine the binding affinities of effective conjugates. The results of this study demonstrate that steroid-based conjugates have the potential to offer a versatile approach to the treatment of various diseases.

Keywords: Antiproliferative activity, Bioconjugate, 4-methyl-7-hydroxy coumarin, Molecular docking, Steroid.

1. Giriş

Steroidler, biyolojik olarak aktif organik bileşiklerdir ve belirli bir moleküler yapıda düzenlenmiş dört halkanın bir araya gelmesiyle oluşurlar. Steroidlerin biyolojik olarak iki temel fonksiyonu vardır. Birincisi, hücre zarlarının önemli bileşenleri olarak membran akıcılığını değiştirirler. İkincisi ise sinyal molekülleri olarak görev yaparak çeşitli biyolojik süreçleri düzenlerler (İlkar Erdağı ve Yıldız 2022). Bu bileşikler arasında öne çıkanlar arasında kolesterol bulunur. Kolesterol, hücre zarlarının temel

bileşenlerinden biridir ve hücre zarlarının esnekliğini ve sıvılığını korur (Xu ve ark. 2005). Steroidler arasında yer alan bir diğer önemli tür pregnenolon dur. Pregnenolon, steroid hormonlarının üretiminde önemli bir ara madde olarak görev yapar. Bu steroid, beyinde nörotransmitterlerin sentezine katkıda bulunarak nörolojik işlevlerde etkin bir rol oynayabilir (Osuji ve ark. 2010). Kolik asit ise safra asitlerinin bir alt grubunu temsil eder ve sindirim süreçlerinde önemli bir işleve sahiptir. Sindirimde yağ ve vitamin emiliminden, bağırsak

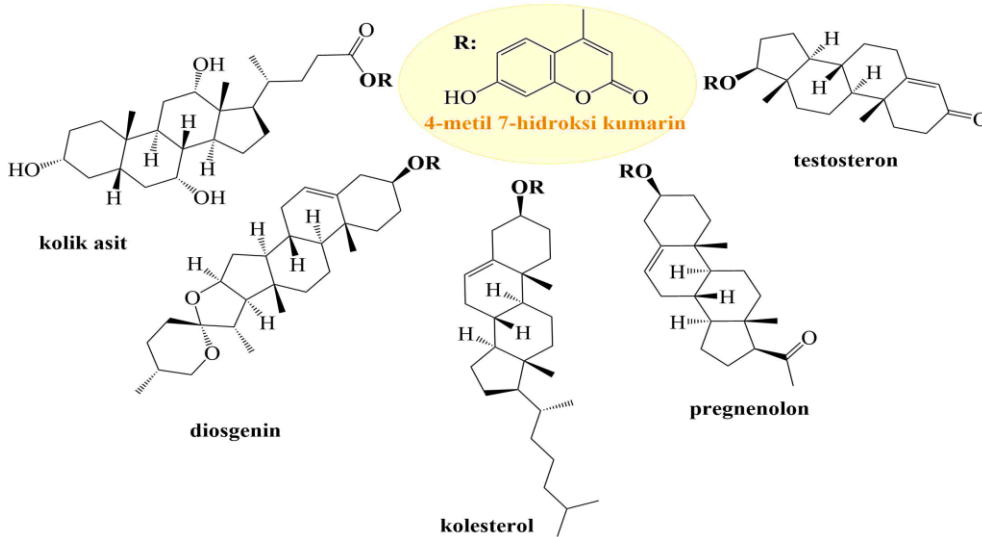
hareketlerini uyararak toksinlerin atılmasına kadar çeşitli etkileri bulunur (Navacchia ve ark. 2020). Dehidroepiandrosteron (DHEA), steroid hormonlarının üretiminde kritik bir rol oynar ve "ana steroid" olarak adlandırılır. Bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde etkili olabilir, bağışıklık fonksiyonlarını artırabilir ve stres tepkisini düzenleyerek vücuttaki dengeyi sağlamaya yardımcı olabilir (Dembitsky ve ark. 2018). Bitkilerde doğal olarak bulunan ve laboratuvar koşullarında diğer steroid hormonlarının sentezinde kullanılabilen bir molekül olan diosgenin, hormonsal dengeyi düzenleme ve anti-enflamatuvar özellikler gibi faydalı etkilere sahip olabilir (İlkar Erdagi ve Uyanik 2019). Son olarak, testosteron, kas gelişimi, kemik sağlığı, kırmızı kan hücresi üretimi, cilt ve saç sağlığı üzerinde önemli etkilere sahiptir. Ayrıca, ruh hali, bilişsel fonksiyonlar ve cilt sağlığı üzerinde de etkileri olabileceği gözlemlenmiştir (İlkar Erdagi 2023). Bu steroidlerin vücutta çeşitli biyolojik işlevleri, sağlıklı bir yaşam için kritik öneme sahip olup, vücutta denge ve düzenin sağlanmasında büyük bir rol oynarlar.

Biyolojik olarak aktif moleküllerin konjuge edilmesi, özellikle kanser gibi çeşitli çoklu işlevli hastalıkları hedeflemek için kullanılan ve ilaç keşfi için güçlü bir araçtır. Bu bağlamda, steroidler diğer biyolojik olarak aktif moleküllerle konjuge etmek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Steroidlerin biyo-konjugasyonu, çoklu işlevli hastalıkların tedavisinde etkili ve umut verici bir strateji olarak öne çıkmaktadır (Bansal ve Suryan 2022). Yapılan steroidal konjugat çalışmaları, izatin-dehidroepiandrosteron (Ke ve ark. 2015), diosgenin aminoasit (Cai ve ark. 2019), estron-doksorubisin ve estron-kitosan (Kurmi ve ark. 2020), ve metotreksat-diosgenin konjugatları (Cai ve ark. 2016) sentezlenmiş ve bu konjugat bileşiklerin insan kanser hücre hatları üzerinde etkili antitümör aktiviteler gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, biyogüvenlik değerlendirmesi sağlıklı hücre hatları üzerinde sitotoksositeye neden olmadığını göstermiştir.

Daha önce gerçekleştirilen çalışmada, bilinen terapötik özelliklere sahip 4-metil-7-hidroksi kumarin bileşiğinin, yaygın biyolojik işlevlere sahip olan steroidlerle birleştirildiği bildirildi. Çalışma kapsamında, kolik asit, diosgenin, kolesterol, DHEA ve testosteron gibi farklı biyolojik etki mekanizmalarına sahip steroid bileşenleri seçildi. Konjugatların yapısal özellikleri hakkındaki sonuçlar ayrıntılı bir şekilde ele alındı. Antiproliferatif aktiviteler, insan eritroid lösemi hücre hattı K562, meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve rahim kanseri hücre hattı HeLa üzerinde *in vitro* koşullarda değerlendirildi. Mevcut çalışmanın temel odak noktası, karakterize edilmiş olan konjugatların özellikle hormona duyarlı (meme ve prostat kanseri) ile diğer (akciğer) kanser hücre hatları üzerindeki *in vitro* antiproliferatif etkileridir. Antiproliferatif aktiviteler, üç farklı insan kanser hücre hattı üzerinde değerlendirildi: östrojen reseptörü negatif MDA-MB-231 meme adenokarsinomu, prostat kanseri PC3 ve akciğer adenokarsinomu A549. Ek olarak, kanser hücresi olmayan sağlıklı MRC-5 kontrol hücre hattı da *in vitro* koşullarda test edildi. Bu çalışma kapsamında, tüm konjugatlar üzerindeki protein-ligand etkileşimlerini ve bağlanma ilgilerini belirlemek amacıyla ilk kez *in silico* moleküler bağlanma çalışmaları gerçekleştirildi. Moleküler bağlanma çalışmaları için meme ve prostat kanseri tedavisinde kullanılan steroidal ajanların çeşitli hedef enzimleri (aromataz CYP19A1, 17α -hidroksilaz/ $17,20$ -liiaz CYP17A1, androjen reseptörü AR ve östrojen reseptörü α ER α) seçildi ve moleküler bağlanma sonuçları, yaygın olarak kullanılan referans ilaçlarla karşılaştırıldı. Bu çalışma, potansiyel yeni kanser ajanlarının keşfi ve değerlendirilmesine temel oluşturmakta olup, belirli enzimlere veya proteinlere karşı etkili bileşiklerin belirlenmesine katkıda bulunarak hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir.

2. Materyal ve Yöntem

Konjugatların sentezi ve karakterizasyonu daha önce yapılan çalışmada bildirildi (İlkar Erdagi 2023). Şekil 1' de şematik olarak karakterize edilen konjugatlar verildi.



Şekil 1. Steroidal konjugatların gösterimi

2.1. Biyolojik testler

2.1.1. *In vitro* antiproliferatif aktivite ve hücre kültürü

Bu çalışmada, üç insan tümör hücre hattı (akciğer adenokarsinomu (A549); meme adenokarsinom, ER-, MDA-MB-231; prostat kanseri, PC3 ve bir kanser olmayan hücre hattı (normal fetal akciğer fibroblastları, MRC-5) (Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC), Manassas, VA, ABD) kullanıldı. Hücreler, Dulbecco'nun modifiye Eagle's Medium'u (DMEM) ile beslenildi, %10 fetal buzağı serumu (FBS, Sigma), antibiyotikler ve antimikotikler (PAN BIOTECH) ile takviye edilen ortamda yetiştirildi ve 37 °C' de %5 CO₂' li ve 100% nemli bir ortamda kültüre alındı. Kültür ortamı alternatif günlerde yenilendi ve hücreler tripsin (0.25%)/etilen diamindiamin tetra asetat (EDTA) (0.02%) içeren fosfat tampon çözeltisi ile ayrılarak subkültüre edildi. Örneklerden ekstrakt elde etmek için elüsyon test yöntemi kullanıldı. Örnekler, %5 FBS ve 100 mg/mL penisilin-streptomisin içeren DMEM içine konularak 0.5 g/mL-1 konsantrasyonda inkübatörde 5 % CO₂ ve 37 °C' de 24 saat boyunca bırakıldı, böylece herhangi bir çözünebilir faktör DMEM' e sızabilmesi engellendi. Elüsyonun ardından, elüentler 0,22 mm'lik bir şırınga kullanılarak sterilize edildi; MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür, Biofroxx, Almanya) testi için taze DMEM kullanılarak çeşitli konsantrasyonlarda konjugatlar hazırlandı.

2.1.2. MTT test

Konjugatların antiproliferatif aktivitesi, test bileşiklerine 48 saat maruz kalma sonrasında tetrazolium renkli MTT testi kullanılarak değerlendirildi. MTT testi, grubumuzun daha önce raporladığı modifiye edilmiş yöntemle göre kullanıldı (İlkar Erdagi ve Yildiz 2022). Hücreler yassı tabanlı 96 kuyucuklu plaklara 104 hücre/200 µL yoğunluğunda ekildi. Ekildikten sonra hücreler, 37 °C' de, %5 CO₂ içeren bir ortamda, 24 saat boyunca inkübatörde bağlanmalarına izin verildi. Kültür ortamı uzaklaştırıldıktan sonra, test bileşiklerinin DMSO içerisinde konsantrasyon gradyanını içeren 0,5 µM ile 100 µM aralığında değişen taze ortam içeren 100 µL yeni bir ortam ile değiştirildi. Göreceli hücre hayatta kalımını belirlemek için özüt içermeyen ortamda bulunan hücreler kullanıldı. Hücreler, pozitif kontrol olarak DMSO (Biofroxx, Almanya) ile işleme alındı. Ekstrakt konsantrasyonlarının eklenmesinden sonra hücreler, sitotoksik ve proliferatif etkileri gözlemlenmek için 48 saat boyunca inkübe edildi. IC₅₀, hücre büyümesini %50 oranında inhibe eden bileşik dozu olarak tanımlandı ve Origin 9 (OriginLab, Northampton, ABD) kullanılarak Boltzmann sigmoid fonksiyonu ile nonlineer regresyon analizi kullanılarak belirlendi. MTT testi, yaşayan hücrelerde mitokondri dehidrogenazları tarafından 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromür (MTT)'ün formazan haline getirilmesine dayanmaktadır. Steroidal sitotoksitenin genel kontrolü olarak formestan ve non-spesifik sitotoksitenin kontrolü olarak doksorubisin kullanıldı. Test edilen hücre hatları için seçiciliği gösteren IC₅₀ değerlerinin normal ve kanser hücreleri için alınan

IC₅₀ değerlerinin oranından hesaplanan Selektivite İndeksi (SI) değerleri belirlendi. SI değeri >3, iyi bir seçiciliği temsil etmektedir. SI, bir normal hücre hattının IC₅₀ değeri ile ilgili kanser hücre hattının IC₅₀ değeri arasındaki oran olarak hesaplandı (Denklem 1).

$$\text{Seçicilik indeksi} = \frac{IC_{50} \text{ normal hücre}}{IC_{50} \text{ kanserli hücre}} \quad (1)$$

2.2. Moleküler bağlanma hesaplamaları

2.2.1. Protein (reseptör) ve ligand yapı koordinatlarının hazırlanması

Antiproliferatif çalışmaları tamamlamak ve steroidal kumarin konjugatları için olası protein hedeflerini önermek amacıyla, moleküler bağlanma simülasyonları AutoDockVina yazılım paketi kullanılarak gerçekleştirildi (Eberhardt ve ark. 2021), (Trott ve Olson 2009)). Çalışmada kullanılan konjugatlar, meme ve prostat kanserinin tedavisine kullanılan steroidal kemoterapötik ilaçların dört protein hedefine karşı test edildi. Protein Data Bank (PDB)' den CYP17A1 (17α-hidroksilaz/C17,20-liaz, PDB Kimlik: 3RUK), CYP19A1 (aromataz, PDB Kimlik: 3EQM), östrojen reseptörü (ERα, PDB Kimlik: 3ERT) ve androjen reseptörü (AR, PDB Kimlik: 2AMA) olan kodlar seçildi. Enzim yapı koordinatları ve üç boyutlu yapısı protein veri bankasından alındı (<http://www.rcsb.org>). Antagonist konformasyonları için arama kutusu, ko-kristallenmiş ligandın merkezi etrafında yer aldı ve 40 Å × 40 Å × 40 Å boyutunda bir alan kullanıldı. AutoDock Vina algoritmasının gerçekleştirdiği örnekleme miktarını artırmak için bir exhaustiveness değeri 16 alındı. Yüksek bir exhaustiveness değeri, bir minimumu (bağlanma enerjisi) bulamama olasılığını azaltır, bu değeri 8'e varsayılan değerini azaltır (Rocha-Roa ve ark. 2023). A zinciri dışındaki zincirler, ligand ve su molekülleri için koordinatlar bir metin düzenleyici kullanılarak kaldırıldı, polar hidrojenler ve Kollman yükleri AutoDock Tools 1.5.7 kullanılarak eklendi. İnhibitör test bileşiklerinin konformasyonel analizi Avogadro yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi ve en kararlı konformasyonlar MMFF94s ile optimize edildi. Aktif bölge koordinatları Discovery Studio Visualizer 2021 ile belirlendi. Tüm ligand-protein bağlanma hesaplamaları, AutoDock Vina yazılımını kullanarak rijit protein içinde esnek bir ligand olarak gerçekleştirildi. Bağlanma enerjisi (kcal/mol) açısından ligandın en iyi bağlanma modu seçildi ve kullanıldı. Kontrol bağlanma çalışmaları, reseptörlerin X-ışını kristal yapılarında bulunan ligandları kullanarak gerçekleştirildi. Tüm kontrol tekrar bağlanma çalışmaları, ilgili kristal yapılarında bulunan ligand-protein geometrilerini üretti (RMSD ≤1.16). Formestanın iyi bilinen bir CYP19 inhibitörüdür ancak karmaşıktaki çözülen bir kristal yapısı bulunmamaktadır. Bu nedenle CYP19 bağlanma simülasyonlarında karşılaştırma için dahil edildi (Nikolic ve ark. 2015). Tahmin edilen bağlanma enerjileri yaklaşık olarak <10 kcal/mol bulunduğu bildirildi, bu, kontrol bağlanma çalışmalarına dayanarak önemli olarak kabul edildi.

2.3. İstatistiksel analiz

Tüm istatistiksel analizler, varyans analizi (ANOVA) kullanılarak %5 olasılık düzeyinde gerçekleştirildi. ANOVA, farklı gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılığı belirlemek için kullanıldı. Tüm ölçümler en az üç tekrar için yapıldı. Tüm çalışmalarda, $p < 0.05$ istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi. Sonuçlar, her biri ortalama standart hata olarak sunuldu.

2.4. Kısaltmalar ve semboller listesi

ATCC	American Type Culture Collection
A°	Angström
DHEA	Dehidroepiandrostan
DMSO	Dimetilsülfoksit
DOX	Doksorubisin
DMEM	Dulbecco'nun modifiye Eagle's Medium'u
EDTA	Etilen diamindiamin tetra asetat
FBS	Fetal buzağı serumu
IC ₅₀	İnhibisyon konsantrasyonunun %50' si
K562	İnsan eritroid lösemi hücre hattı
kCal	Kilo kalori
RMSD	Kök ortalama kare sapma
HeLa	Rahim kanseri hücre hattı
MCF-7	Meme kanseri hücre hattı
MTT	(3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
ER	Östrojen reseptör
MDA-MB-231	Östrojen reseptörü negatif meme adenokarsinomu
PC3	Prostat kanseri
PDB	Protein Data Bank
SI	Selektivite İndeksi
ΔG	Serbest enerji

3. Sonuçlar ve Tartışma

3.1. Steroidal kumarin konjugatların *in vitro* antiproliferatif aktivitesi

Kumarin bileşiği ile konjuge edilmiş steroidlerin antiproliferatif hücre potansiyellerinin ve çeşitli steroid bileşiklerinin etkisinin değerlendirilmesi (konjugatlar **5-9**), insan kanser hücre hatlarına (MDA-MB-231 (insan meme adenokarsinomu, ER, triple-negatif), PC3 (prostat kanseri) ve A549 (insan akciğer kansinomu)) karşı standart MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazo-liumbromür) testi kullanılarak yapıldı. Sitotoksisite kontrolü olarak, sağlıklı kanser olmayan MRC-5 (fetal akciğer fibroblastları) kullanıldı. Sonuçlar, seçici olmayan sitotoksik bir ilaç olan doksorubisin (DOX) ve steroidal CYP19/aromatizaz inhibitörü formestan karşısında değerlendirildi. Konjugatların antiproliferatif aktiviteleri, Tablo 1'de listelenen IC₅₀ parametreleri olarak ifade edildi. (Tablo 1). Tablo1' de verilen sonuçlar, tüm konjugatların bu üç tümör hücre hattına karşı yüksek ila orta derecede sitotoksisite gösterdiğini ve IC₅₀ değerlerinin nispeten düşük μM konsantrasyon aralığında olduğunu gösterdi (IC₅₀ 16.4-36.7 μM). Diğer yandan, MRC-5 hücre hattı için sitotoksisiteleri kontrol grubuna benzer olup, bu da incelenen bileşiklerin test aralığı içinde toksik olmadığı sonucunu verdi (IC₅₀>100 μM).

Tablo 1 Steroidal konjugatların (5-9) ve anti-kanser ilaçlarının *in vitro* antiproliferatif aktiviteleri

Konjugat	MDA-MB-231		PC3		A549		MRC-5 ^c
	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI	IC ₅₀
5	22.8	> 4.4	20.1	> 5.0	28.7	> 3.5	> 100
6	30.4	> 3.3	18.6	> 5.4	14.8	> 6.8	> 100
7	33.4	> 3.0	26.4	> 3.8	20.2	> 5.0	> 100
8	16.4	> 6.1	11.3	> 8.8	24.6	> 4.1	> 100
9	33.1	> 3.0	10.5	> 9.5	32.5	> 3.1	> 100
Formestan ^a	56.3	> 1.8	96.3	> 2.1	38.6	>2.6	>100
Doksorubisin ^b	0.16	0.8	46.7	< 0.01	16.9	< 0.01	0.12

Her test bileşiği konsantrasyonu için dört kez tekrarlanan iki bağımsız deneme gerçekleştirildi. Her konsantrasyon için ortalama değerler ve standart sapmalar (SD) hesaplandı ve IC₅₀ değerleri olarak verildi. a. Meme kanseri karşı klinik kullanımda olan kontrol steroid bileşiği, b. Kontrol antiproliferatif bileşiği, c. Kanser dışı kontrol.

Anti-kanser ilaç adaylarının gerçek terapötik potansiyelini belirlemek için normal hücrelere karşı seçiciliklerini değerlendirmek önemlidir. Bileşiğin kanser hücrelerine karşı güvenli seviyesini gösteren Seçicilik İndeksi (SI), bize değerli tahminler sağlar. Daha yüksek SI değeri, daha büyük bir anti-kanser özgüllüğünü gösterir ve SI değeri 3.0'un üzerinde olan bileşikler, yüksek seçici ajanlar olarak kabul edilir (Michalak ve ark. 2020)). Doksorubisin gibi yaygın kullanılan anti-kanser ilacının, SI değerlerine bakıldığında (MDA-MB-231 için 0.8 ve PC3 ve A549 için <0.01), düşük seçicilik indekslerinin hem kanser hem de

normal hücrelere karşı toksik olmalarının dezavantajını gösterdi. Çalışılan steroidal konjugatların ise kanser hücrelerine karşı yüksek sitotoksik aktivite sergilerken sağlıklı hücreye karşı toksik etkilerinin olmadığı, konjugatların yüksek SI değerleri ile desteklendi (SI=3.0–9.5). Yapılan değerlendirmede, referans ilaç DOX'un sağlıklı MRC-5 hücrelerine yüksek toksik etkisi olduğu, seçicilik indeksinin düşük olduğu (SI= 1.0 ve 0.06) ve genel anlamda sitotoksik etkisinin olduğu görüldü. Diğer yandan DOX, PC3 hücreleri üzerinde etkisinin olmadığı daha önceki çalışma raporları ile uyumlu olarak bulundu.

Formestan için elde edilen verilerden hem kanser ham de sağlıklı hücreler üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı ve yüksek IC₅₀ değerlerine sahip olduğu görüldü (SI=>1.8).

Test edilen tüm konjugatlar (**5-9**), meme kanseri hücreleri (MDA-MB-231) karşısında düşük konsantrasyonlarda antiproliferatif aktivite sergiledi. IC₅₀ değerleri 16.0 ile 37.0 µM arasında değişmekte olup, bu sonuçların steroid konjugatlarının MDA-MB-231 hücre büyümesini inhibe etmede genel bir rol oynadığını gösterdi. Doksorubisin meme kanseri hücreleri üzerinde antiproliferatif aktivitesi IC₅₀ değeri olarak 0.16 mM olarak bulundu. Özellikle konjugatlar arasında konjugat **8**, DHEA grubunun varlığı sayesinde, en düşük IC₅₀ (16.4 µM) değerine sahip antiproliferatif aktivite sergiledi. Referans ilaç ile kıyaslandığında, DOX'in aksine konjugat **8**' in inhibe etme konsantrasyonu daha yüksektir ancak SI değeri olarak bakıldığında meme kanseri hücreleri için özgül olabileceğini göstermektedir. DHEA, vücutta hem testosteron hem de estron'a metabolize olur ve laboratuvar hayvanlarında hem androjenik hem de östrojenik etkilere yol açar. DHEA'nın meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını östrojen reseptörü aktivasyon yoluyla inhibe ettiği daha önce yapılan çalışmalarda önerildi (Matsuzaki ve Honda, 2006)). MDA-MB-231 meme kanser hücreleri üçlü negatiftir ve üçlü negatif meme kanserleri, hasta öngörüsü zayıf olan kanser türleri ile ilişkilendirilir. Bugüne kadar üçlü negatif meme kanserleri için az sayıda hedefe yönelik tedavi geliştirilmiş olduğundan, MDA-MB-231 hücre hatlarının proliferasyonunu inhibe eden bileşiklerin tanımlanması, daha etkili tedavilerin gelecekte geliştirilmesi için önemli olabilir.

Neredeyse tüm bileşikler PC3 prostat hücreleri karşısında güçlü antiproliferatif aktivite gösterdi. Konjugatlar arasında, **9**, 3-okso-4-en sistemine sahip olarak en yüksek antiproliferatif etki (IC₅₀ 10.5 µM) sergiledi, konjugatlar **8** ve **6**, kanser hücrelerini benzer olarak düşük konsantrasyon değerlerinde inhibe etti (sırasıyla IC₅₀ 11.3 µM ve 18.6 µM). Tablo 1' den, test edilen tüm bileşiklerin PC3 hücrelerine karşı Formestan' den daha güçlü sitotoksik aktivite gösterdiği sonucuna varıldı. DOX ise sitotoksik olarak etkisiz olduğu görüldü (IC₅₀ 96.3 µM). Formestan'ın CYP19, 5α-redüktaz ve steroidogenez ve hücre proliferasyonunda yer alan diğer enzimlerin bilinen bir inhibitörü olduğu bilinmektedir (Savić ve ark., 2020). Formestan'ın PC3 kanser hücreleri üzerine antiproliferatif etkisi DOX ile kıyaslandığında yüksek olduğu görüldü (IC₅₀ 46.7 µM). Akciğer kanser hücreleri A549 açısından değerlendirildiğinde, konjugatlar arasında **6**' nın, en düşük konsantrasyonda sitotoksik etki gösterdiği elde edildi (IC₅₀ 14.8 µM). Diosgenin yapısındaki hetero şeker bileşiği (E ve F spiro halkalar) ve 5,6-çift bağ, A549 hücrelerinin çoğalmasını engelleyebilme ve apoptozu tetiklemesinin p13k/Akt yollarının baskılanmasının bir sonucu olduğu, ayrıca A549 hücre hattında hTERT gen ifadesini azalttığı

yapılan çalışmalarda bildirildi (Xu ve ark. 2019; Trouillas ve ark. 2005). DOX' e kıyasla tüm konjugatların etkisi düşüktür. Ancak SI değeri ile karşılaştırıldığında konjugatların kanserli hücreye daha seçici inhibisyon sergiledikleri görüldü. DOX' nin A549 hücrelerine karşı SI değeri < 0.01 iken bu değer konjugat **6** için > 6.8 olarak bulundu.

In vitro çalışma sonuçlarına göre, konjugatların antiproliferatif aktivitesinin öncelikle kumarin halkasının steroid bileşiklerine dahil edilmesi ile ilişkili olduğunu gösterdi. Kumarin halkasının, hücre döngüsünün düzenlenmesi, apoptozisin uyarılması ve tümör hücrelerinin büyümesini ve ilerlemesini teşvik eden hiyalüronik asit sentezini inhibe ettiği daha önce yapılan çalışmalarda bildirildi (Hani ve ark. 2016). Bu çalışmada elde edilen *in vitro* sonuçlar, tüm konjugatların çeşitli hücre hatlarına karşı antiproliferatif etki gösterdiklerini sergiledi. Bu etkilerinin belirleyicilerinden biri, steroid bileşiklerinin lipofilitesidir. Spesifik olarak çalışmada kullanılan steroid bileşiklerin birçok nükleer ve transmembran reseptörün aktivasyonunu veya inhibisyonunu düzenleyerek, kanser hücrelerinin ilerlemesi ve metastazı ile yakından ilgili olduğu yine bildirilen çalışmalarda bulundu (İlkar Erdagi 2023; Kowalczyk ve ark. 2021).

3.2. Steroidal kumarin konjugatlarının *in silico* moleküler bağlanma çalışmaları

Her canlı sistemde (insan, hayvan, bitki, mantar veya bakteri), herhangi bir fonksiyon veya etkinlik, moleküler, hücresel veya organ seviyesinde biyolojik olaylara çevrilebilir. Steroidal konjugatların antiproliferatif aktiviteleri üzerine bir çalışma yapıldı ve moleküler bağlanma çalışması, molekülün temel etkinlik öngörüsü araştırmasından sonra geldi (Mahalakshmi ve Parthasarathy 2023). Moleküler bağlanma çalışmaları, yan etkisi olmayan veya minimum yan etkisi olan ilaçların keşfi için yaygın olarak kullanılan, ilaç tasarımında gerekli ve önemli bir adımdır. Hedef proteinlerin seçimi ve önceliklendirilmesi, bir hastalığa dayalı olarak çalışmak için literatür ve veri tabanlarında veri madenciliği yöntemleri ile gerçekleştirilir, bu sayede proteinle etkileşme sonuçları elde edilir (Yu ve ark. 2018).

Moleküler bağlanma genellikle, ligandın ve hedef biyomolekülün konformasyonlarının reseptörün belirlenen aktif bölgesinde geometrik optimizasyonunu içeren iki aşamalı bir süreçten oluşur (Cortes ve ark. 2005). Ardından, bunları skorlama işlevlerine göre sıralayarak, bu skorlama işlevi, kullanılan yazılımın geliştirilmesinde kullanılan algoritmaya bağlı olarak bir yazılımdan diğerine farklılık gösterir. Potansiyel, *in vitro* uygulamada doğru bağlanma modunu ne kadar iyi tahmin ettiğinde yatar (Sreenatha ve ark. 2022). Bu nedenle, yeni tasarlanan konjugatlara (**5-9**) için aromataz, 17,20-liaz, androjen reseptör ve östrojen reseptör alfa alanına karşı uygulanan moleküler bağlanma çalışmaları yapıldı.

Tablo 2 Steroidal konjugatların (5-9) ve anti-kanser ilaçlarının protein hedefleri olan aromataz (CYP19), 17,20-liaz (CYP17), androjen reseptörü (AR) ve östrojen reseptörü (ER α) ile moleküler bağlanma enerjileri (ΔG (kcal/mol))

Konjugat	CYP19	CYP17	AR	ER α
5	-11.56	-11.38	-9.40	-11.65
6	-11.31	-11.37	-9.64	-11.13
7	-11.94	-12.09	-9.00	-10.61
8	-12.94	-12.37	-9.93	-11.32
9	-12.56	-12.07	-9.14	-10.13
AER		-10.67		
ASD	-10.67			
OHT				-9.94
DHT			-11.19	
Formestan ^a	-11.80			

^a referans inhibitör (Nikolic ve ark. 2015)

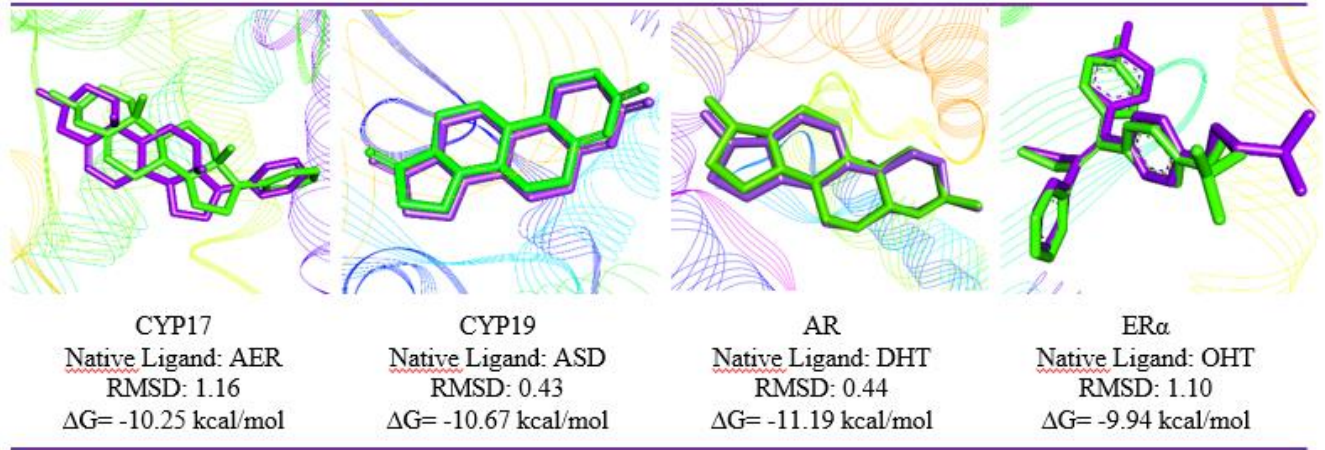
Dört farklı hedef proteine konjugatlar iyi bağlanma afinitesi gösterdi ve elde edilen sonuçlar Tablo 2' de verildi. Konjugat ligandların, genellikle π -alkil, π - π kontakları, π -donör hidrojen, karbon-hidrojen ve konvensiyonel hidrojen bağları gibi çeşitli etkileşimler aracılığıyla proteinlerle etkileşime girdiği görüldü. Bağlanma prosedürünü doğrulamak için kristalize enzim ve reseptör yapılarındaki doğal ligandlar (CYP17A1 için Abirateron (AER), CYP19A1 için Androstendion (ASD), AR için Dihidrotosteron (DHT), ve ER α için 4-hydroxytamoxifen (OHT) kendi orijinal bağlanma bölgelerine tekrar bağlandı. Tüm kontrol bağlanma simülasyonları, ilgili kristal yapıdaki ligand-protein geometrilerini üretti. Kristal yapılarda ligandların tekrar bağlanması, bağlanmış ligandın ve X-ışını kristal yapılarından elde edilen koordinatlar arasında kök ortalama kare sapma (RMSD) ≤ 1.2 Å ile başarılı bir şekilde gerçekleştirildi (Şekil 2). Formestanın hedefi CYP19 ile çözülmüş bir kristal yapısı olmasa da formestan iyi bilinen bir CYP19 inhibitörüdür ve bu nedenle CYP19 bağlanma simülasyonlarında karşılaştırma amacıyla dahil edildi. Tahmini bağlanma enerjileri yaklaşık olarak $\Delta G < -10$ kCal/mol, kontrol bağlanma çalışmalarına dayanarak önemli kabul edildi.

Tekrar bağlanma işleminden elde edilen RMSD değerleri 1.2 Å' un altındadır bu çalışmada kullanılan protokolün geçerli olduğu ve ligand bileşiklerin (5-9) bağlanma çalışması için uygun olabileceği anlamına gelmektedir (Şekil 2). Her bağlanma hesaplanmasında dokuz bağlanma konumu oluşturuldu ve elde edilen en yüksek bağlanma skoru (serbest enerji = $\Delta G = -kcal/mol$) seçilerek verildi. Orijinal ligandlar ve konjugatların çalışılan enzim ve reseptörler için bağlanma skorları Tablo 2' de verildi. Tüm bağlanma skorları incelendiğinde, konjugat 8'in dört reseptöre karşı en yüksek bağlanma skoru gösterdiği görüldü. CYP17A1 ve CYP19A1' e karşı yapılan bağlanma skorları, konjugatların tümünün (5-9), sırasıyla referans ligandlar AER ve ASD' den ($\Delta G = -10.25$

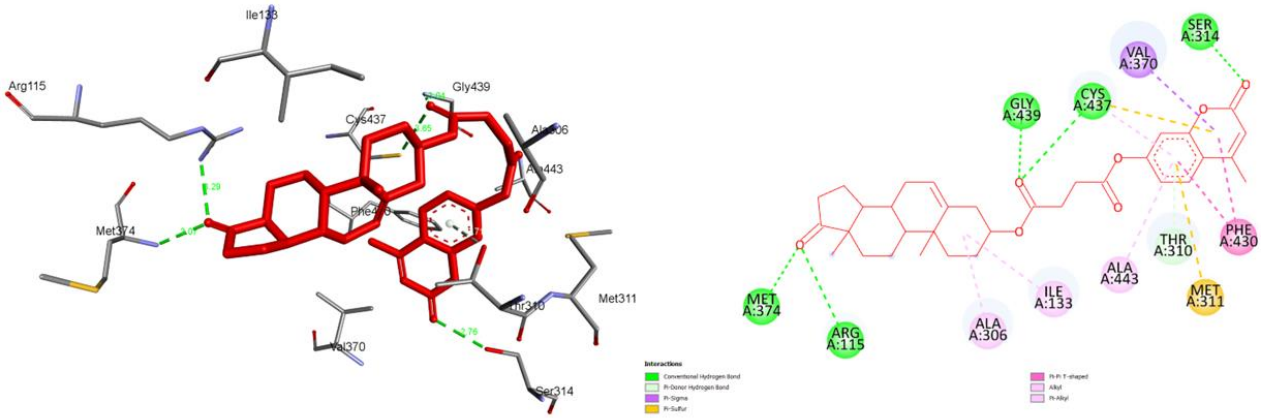
kCal/mol ve $\Delta G = -10.67$ kCal/mol) daha yüksek bağlanma skorlarına ($\Delta G = 11.37$ ile -12.37 kCal/mol ve $\Delta G = -11.31$ ile -12.94 kcal/mol arasında) sahip olduğunu gösterdi.

Diğer yandan AR' e karşı yapılan bağlanma skorları, konjugat 8 ($\Delta G = -9.93$ kcal/mol) için en yüksek olduğu ve referans ligand DHT' den ($\Delta G = -11.19$ kcal/mol) daha düşük bağlanma skorlarına sahip olduğunu gösterdi. Son olarak ER α ' e karşı yapılan bağlanma skorları, tüm konjugatların, referans ligand OHT' den ($\Delta G = -9.94$ kcal/mol) daha yüksek bağlanma skorlarına sahip olduklarını gösterdi. Konjugatlar arasında 8 ve 5 sırasıyla $\Delta G = -11.32$ kcal/mol ve $\Delta G = -11.65$ kcal/mol en iyi bağlanma skorlarına sahip bileşikler olarak belirlendi. Konjugatlar yapılarındaki steroid halkası ve kumarin gruplarının birden fazla protein fonksiyonel grubuyla polar temas oluşturma yeteneği sayesinde, bu konjugatların birden fazla hedefe önemli bir afinite ile bağlanması tahmin edilmektedir. Elde edilen sonuçlardan bu konjugatların, steroid üretiminde dahil olan birden fazla hedefi inhibe edebilecek yeni steroidal hibrit bileşiklerin tasarımı için kullanışlı olabileceğini öne sürmektedir.

Moleküler bağlanma simülasyonları sonrasında elde edilen konjugat 8'in aromataz (CYP19), 17,20-liaz (CYP17) ve AR' e ve konjugat 8 ve 5'in ER' e karşı bağlanma önerilen modelleri sırasıyla Şekil 3-6' da sunuldu. Ligandların reseptör proteinlerine bağlanması genellikle zayıf etkileşimlerle gerçekleşir, bu da iyonik bağlar, hidrojen bağları, Van der Waals etkileşimleri ve hidrofobik etkiler gibi etkileşimleri içerir. Bu nedenle, mevcut araçların kullanılabilirliğine bağlı olarak, ligandlar ile reseptörler arasındaki hidrojen bağı ve hidrofobik bağ oluşumlarına katılan kalıntıları analiz edildi. İlk olarak, elde edilen konformasyonlar Discovery Studio ile görselleştirildi ve reseptör ile ligandlar arasında oluşan hidrojen bağları incelendi.



Şekil 2. Yeniden bağlanma konformasyonların ve deneysel konformasyonların örtüşmesi

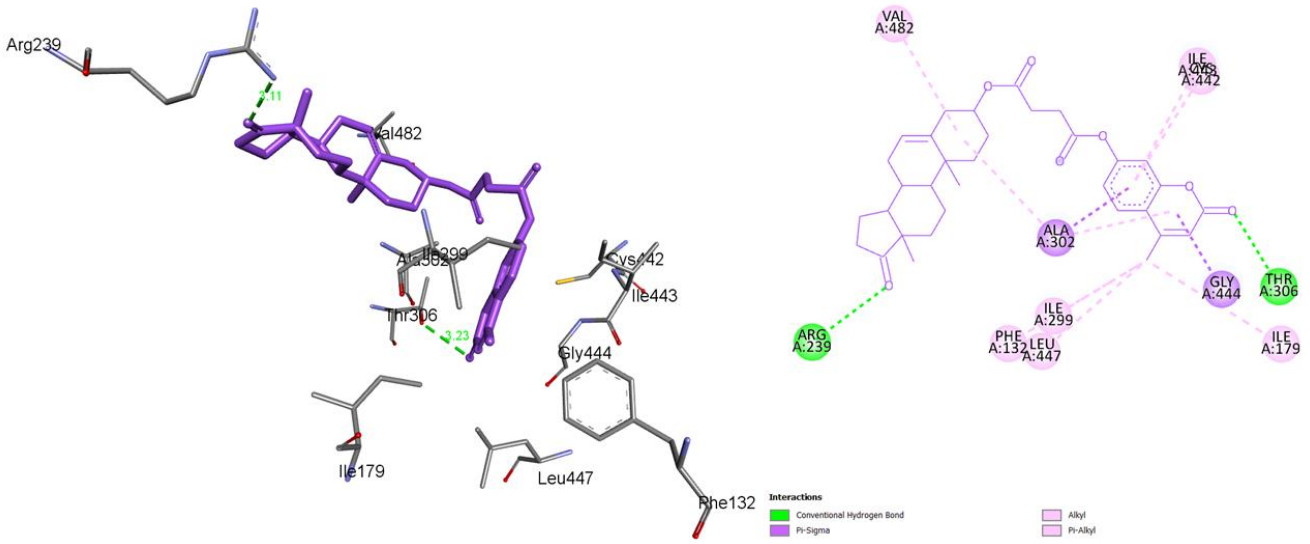


Şekil 3. CYP19 (PDB ID: 3EQM) ile konjugat 8' in ligand-protein etkileşimleri

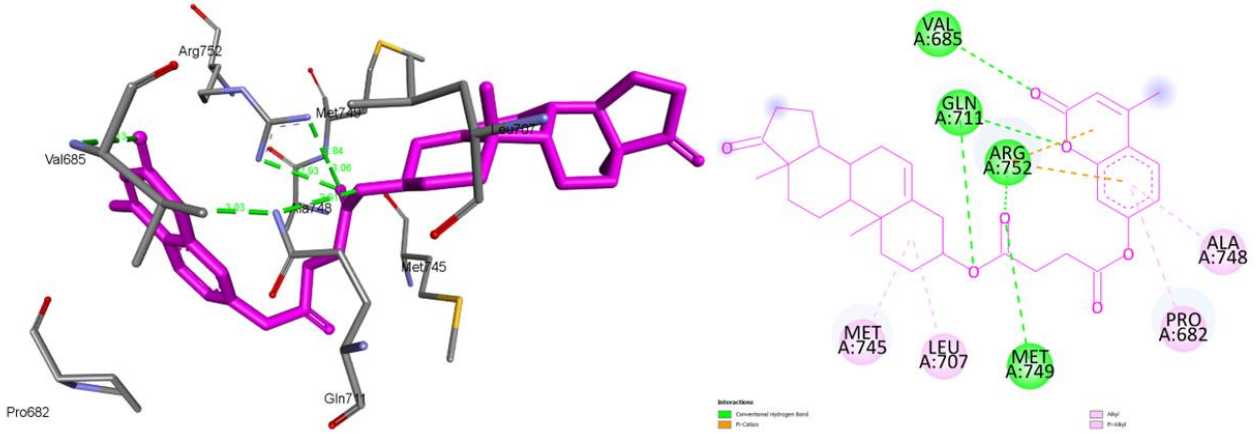
İnsan plasental aromataz sitokrom P450 kristal yapısı (androstendion kompleksi tarafından inhibe edilmiş oksidoredüktaz) 3EQM, tüm konjugatlar (5-9) ile moleküler bağlanma işlemine tabi tutuldu (Ghosh ve ark. 2009). Konjugat arasında 8' in iyi bir bağlanma enerjisi gösterdiği ($\Delta G = -12.94$ kCal/mol) ve π -sülfür, π -alkil, alkil, π - π T şekilli, π -sigma, π -donör hidrojen bağları ve konvensiyonel hidrojen bağları ile güçlü etkileşimler sergilediği tespit edildi. Bu etkileşimlerden konvensiyonel hidrojen bağlarının, sırasıyla Met374 ve Arg115 kalıntıları arasında 4.32 Å ve 4.59 Å açılarında, Gly439 ve Cys437 kalıntıları arasında 3.52 Å ve 4.93 Å açılarında ve son olarak Ser314 kalıntısı ile 4.60 Å açısında olduğu belirlendi. Bu bağlanma etkileşimlerinin 2D ve 3D görüntüleri Şekil 3' te detaylandırıldı. Konjugat 8' in aromataz' a bağlanması, doğal ligand olan androstendion ile kristal yapısında görülenle benzer bir yapı sergilediği öne sürüldü. Steroid molekülünün bir tarafında, 17-keton fonksiyonunun (D halkası) Arg115 kalıntısı ile ve Met374' in amino grubu hidrojen bağları oluşturduğu görüldü. Diğer tarafta ise konjugat 8' in kumarin halkası 2-keton fonksiyonunun Ser314' ün hidroksiline bağlandığı ve konjugasyonu sağlayan süksinat grubu üzerindeki keton

fonksiyonel grubunun Gly439 amino grubu ile Cys437 omurgası ile hidrojen bağları oluşturduğu gözlemlendi.

İnsan sitokrom P450 CYP17A1 kristal yapısı (abirateron kompleksi tarafından inhibe edilen oksidoredüktaz, 17,20-liaz) 3RUK, tüm konjugatlar (5-9) ile moleküler bağlanma işlemine tabi tutuldu (DeVore ve Scott 2012). Konjugat 8' in, 17,20-liaz' a bağlanma çalışmalarında, ligandın reseptöre bağlanmasını önerildi ve Şekil 4' te 2D ve 3D görüntüleri ile verildi. Böylece steroid halkasında polar temaslar oluşurken, süksinat grubu keton gruplarının, Cys442 ve Arg96 kalıntıları ile sırasıyla 5.01 Å ve 6.91 Å açılarında konvensiyonel hidrojen bağları oluşturdukları görüldü. Diğer yandan, kumarin halkası ile Cys442 kalıntısı arasında 5.92 Å açısında konvensiyonel hidrojen bağları olduğu gözlemlendi. Konjugat 8 ile enzim arasında ayrıca π -sülfür ve π -alkil ile etkileşimler yaptığı önerildi. Abirateron doğal ligandının kristal yapısındaki 17, 20-liaz' a bağlanmasıyla konjugat 8' inin benzer olduğu elde edildi. Tahmini bağlanma enerjisi $\Delta G = -12.37$ kCal/mol iken, abirateron ile tekrar bağlanma sonrasında tahmini bağlanma enerjisi $\Delta G = -10.25$ kCal/mol olarak hesaplandı



Şekil 4. CYP17 (PDB ID: 3RUK) ile konjugat 8' in ligand-protein etkileşimleri

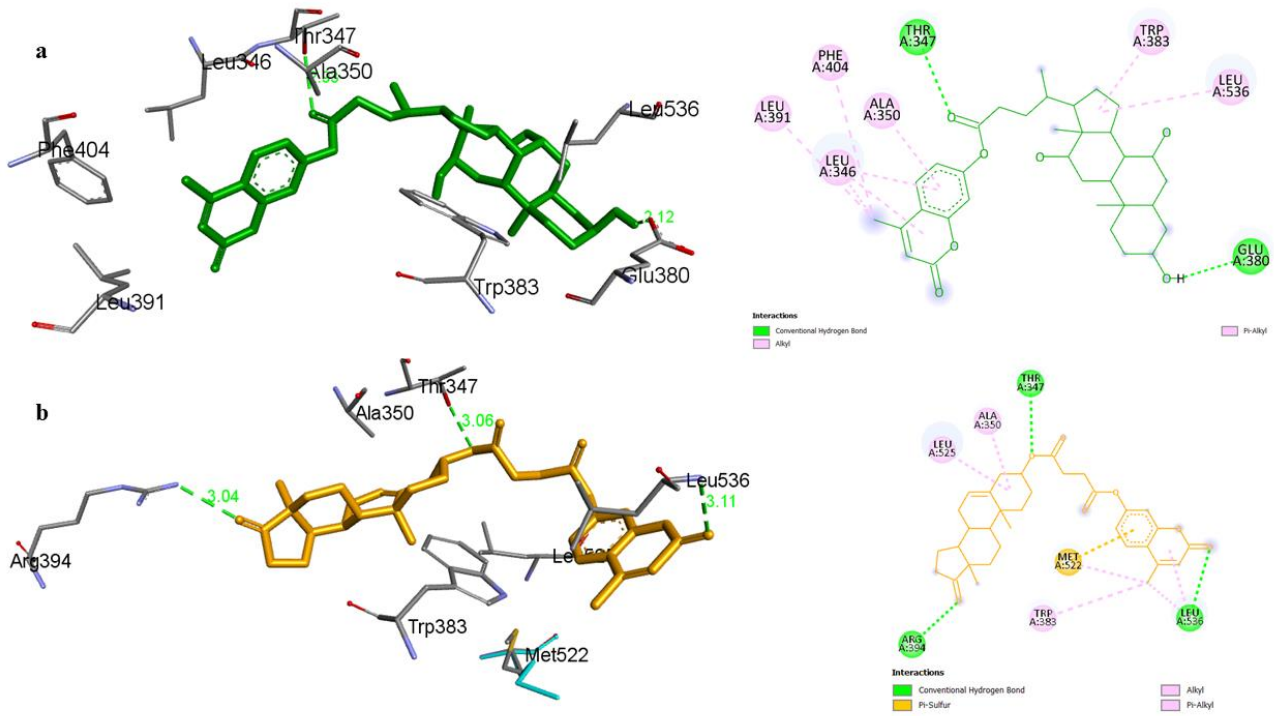


Şekil 5. AR (PDB ID: 2AMA) ile konjugat 8' in ligand-protein etkileşimleri

İnsan androjen reseptörü ligand bağlama bölgesinin dihidrotestosteron (DHT) ile kompleks halindeki kristal yapısı, 2AMA, konjugatlar (5-9) ile ağlanma analizine tabi tutuldu. Hidrofobik ve esnek cepleri içeren kristal yapının Arg 752 ve Gln 711 olmak üzere iki derin kalıntı içerdiği görüldü (Pereira de Jesus-Tran ve ark. 2006). Doğal ligand DHT, AR' e yüksek afiniteye sahiptir ($\Delta G = -11.19$ kCal/mol). Konjugatlar arasında, 8' in güçlü etkileşimler nedeniyle iyi bir bağlanma enerjisi sağladığı belirlendi ($\Delta G = -9.93$ kCal/mol). Bu etkileşimler, π -kation, π -alkil, alkil ve konvensiyonel hidrojen bağlarıdır. Konjugat 8' in süksinat grubu, Gln711, Met749 ve Arg752 kalıntıları ile bağ açılıarı 2.91, 3.06 \AA ve 2.84 (2.93) \AA olan konvensiyonel hidrojen bağları yaptığı ve aynı zamanda kumarin grubu üzerinden bağ açısı 3.13 \AA Val685 kalıntısı ile etkileşimde bulunduğu önerildi. Bu hidrojen bağı etkileşimleri DHT ile görülen ile benzerdir. Konjugat 8' in yaptığı ek hidrofobik etkileşimler, 2D ve 3D görüntüleri ile Şekil 5' te verildi.

İnsan östrojen reseptörü alfa ligand bağlama alanı, sentezlenen konjugatlar (5-9) ile 3ERT' in 4-

hidroksitamoksifen (OHT) ile kompleks halinde bağlanma işlemine tabi tutuldu (Shiau ve ark. 1998). ER' ün OHT ile oluşturdukları hidrojen bağlarına katılan kalıntılar Arg394 ve Glu353 olarak belirlendi (Shiau ve ark. 1998). Konjugatlar arasında, 5, iyi bir bağlanma enerjisine sahip olduğu ($\Delta G = -11.65$ kCal/mol) ve π -alkil, alkil ve π -sigma gibi hidrofobik etkileşimler dışında Thr347 ve Glu380 kalıntıları ile sırasıyla 2.33 ve 2.12 \AA açısında güçlü hidrojen bağları olduğu görüldü (Şekil 6a). Diğer yandan, konjugat 8, ikinci en iyi bağlanma enerjisine sahipti ($\Delta G = -11.32$ kCal/mol) ve π -alkil, π -sülfür, alkil ve konvensiyonel hidrojen bağları etkileşimlerine sahip olduğu tahmin edildi. Konjugat 8' in Arg394, Thr347 ve Leu536 kalıntıları ile sırasıyla 3.04 \AA , 3.06 \AA ve 3.11 \AA açılarında konvensiyonel hidrojen bağı etkileşimleri yaptığı Şekil 6b' de verildi. Konjugat 8' in 17-karbonil grubu ile Arg394 kalıntısının NH_2 grubu arasında güçlü bir hidrojen bağı gözlemlendi. Arg394 hem OHT hem de konjugat 8 ile etkileşimde ortak bir rol oynar. Bu konjugat 8' in ER için önemli bir ligand olabileceğini ve dolayısıyla ER fonksiyonu üzerinde inhibe edici bir etki gösterebileceği sonucuna varıldı.



Şekil 6. ER (PDB ID: 3ERT) ile konjugat 5 ve 8' in ligand-protein etkileşimleri

4. Sonuç

Bu çalışmanın sonuçları, karakterize edilen steroidal kumarin konjugatlarının potansiyel anti-proliferatif ve antikanser etkilerini ortaya koymaktadır. Konjugatlarının *in silico* moleküler bağlanma çalışmaları, *in vitro* anti-proliferasyon ve antikanser potansiyelleri değerlendirildi. Kumarin bileşiğinin steroid halkasına dahil edilmesinin etkileri incelendi. Moleküler bağlanma simülasyonları, meme, prostat ve akciğer kanser tedavisinde klinik olarak kullanılan steroidal kemoterapötik ajanların çeşitli hedefleri (Aromataz (CYP19A1), androjen reseptörü (AR), 17 α -hidroksilaz/17,20-liaz (CYP17A1) ve östrojen reseptörü α (ER α) karşısında gerçekleştirildi. Konjugat 8' in yüksek afiniteli olarak birden fazla moleküler hedefe bağlanabileceği öngörüldü. Antiproliferatif aktivite, üç insan kanser hücre hattında (meme adenokarsinomu (MDA-MB-231); prostat kanseri (PC3) ve akciğer adenokarsinomu (A549)) *in vitro* olarak ölçüldü. Konjugatların antiproliferatif etkileri, formestan ve doksorubisin gibi referans ilaçlarla karşılaştırılarak değerlendirildi. Sitotoksik olarak etkileri belirlenmek için normal kanser olmayan kontrol hücre hattına karşı (MRC-5) minimum inhibisyon konsantrasyonları belirlendi. Çoğu konjugat, moleküler bağlanma sonuçlarına uyumlu olarak çeşitli kanser hücre hatlarının büyümesini inhibe ettiği görüldü. Bazı konjugatlar, kanser hücre hatlarına karşı referans ilaç doksorubisinden daha yüksek antiproliferatif aktivite sergilerken, tüm konjugatların kanserli olmayan sağlıklı hücrede toksisiteye neden olmadığı tespit edildi. Moleküler bağlanma taramasından elde edilen steroidal konjugatlar ile enzim hedefleri arasında gösterilen iyi bağlanma enerjisi, bu konjugatları potansiyel bir antiproliferatif ajan olarak değerli kılmaktadır. Sonuçlar,

steroidal konjugatların, birden fazla steroidogenez yolunu modüle eden bileşiklerin tasarımında kullanılabilecek esnek yapılar olduğunu göstermektedir. Biyolojik olarak aktif grupların konjugasyonu veya modifikasyonu, yapı-aktivite ilişkilerini daha iyi anlamaya ve ilgili hedef enzimlerin etkin bölgesindeki önemli etkileşimleri belirlemeye yardımcı olabilir.

Teşekkürler

Prof. Dr. Ufuk YILDIZ' a (Kocaeli Üniversitesi, Kimya Bölümü) önerileri ve Kimya Araştırma Laboratuvarını bu çalışmada kullanılmasına izin verdiği için teşekkür ederim.

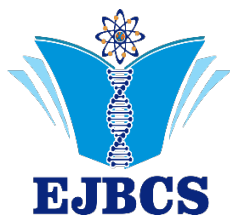
Yazar katkısı: Sevinç İlkar Erdağı: Kavramsallaştırma, Metodoloji, Veri düzenleme, Formal analiz, Proje yönetimi, Yazım-orijinal taslak, Yazım-gözden geçirme ve düzenleme.

Çıkar çatışması açıklaması: Herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederim.

Kaynaklar

- Bansal R, Suryan A. 2022. A Comprehensive Review on Steroidal Bioconjugates as Promising Leads in Drug Discovery. ACS Bio & Med Chem Au. 2(4): 340–369.
- Cai B, Liao A, Lee K K, Ban J S, Yang, H S, Im Y J, Chun C. 2016. Design, synthesis of methotrexate-diosgenin conjugates and biological evaluation of their effect on methotrexate transport-resistant cells. Steroids. 116: 45–51.
- Cai D, Qi J, Yang Y, Zhang W, Zhou F, Jia X, Guo W, Huang X, Gao F, Chen H, Li T, Li G, Wang P, Zhang Y, Lei H. 2019. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Diosgenin-Amino Acid Derivatives with Dual Functions of Neuroprotection and Angiogenesis. Molecules. 24(22): 4025.

- Cortes J, Simeon T, Ruiz de Angulo V, Guieysse D, Remaud-Simeon M, Tran V. 2005. A path planning approach for computing large-amplitude motions of flexible molecules. *Bioinformatics*. 21(1): 116–125.
- Dembitsky V M, Glorizova T A, Imbs A B. 2018. Ferrocene and titanocene steroid conjugates: Structures and activities a brief review. *Vietnam J. Chem*. 56(2): 127–138.
- DeVore N M, Scott E E. 2012. Structures of cytochrome P450 17A1 with prostate cancer drugs abiraterone and TOK-001. *Nature*. 482(7383): 116–119.
- Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack A F, Forli S. 2021. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *J. Chem. Inf. Model*. 61(8): 3891–3898.
- Ghosh D, Griswold J, Erman M, Pangborn W. 2009. Structural basis for androgen specificity and estrogen synthesis in human aromatase. *Nature*. 457(7226): 219–223.
- Hani U, Osmani R A M, Bhosale R R, Shivakumar H G, Kulkarni P K. 2016. Current Perspectives on Novel Drug Delivery Systems and Approaches for Management of Cervical Cancer: A Comprehensive Review. *Curr. Drug Targets*. 17(3): 337–352.
- İlkar Erdagi S. 2023. Steroid-Hymecromone Conjugates with Improved Antiproliferative and Antimicrobial Potential: Synthesis, Biological Evaluation, and *in silico* ADME Prediction. *ChemistrySelect*. 8(25).
- İlkar Erdagi S, Uyanik C. 2019. Biological evaluation of bioavailable amphiphilic polymeric conjugate based on natural products: diosgenin and curcumin. *Int. J. Poly. Mater*. 69(2): 73–84.
- İlkar Erdagi S, Yildiz U. 2022. Synthesis of diosgenin derivatives by A and B ring modifications and low-valent titanium (Ti0)-catalyzed McMurry coupling reactions and designing to create novel biological agents. *J. Mol. Struct*. 1256: 132511.
- Ke S, Shi L, Yang Z. 2015. Discovery of novel isatin-dehydroepiandrosterone conjugates as potential anticancer agents. *Bioorganic Med. Chem. Lett*. 25(20): 4628–4631.
- Kowalczyk W, Waliszczak G, Jach R, Dulinska-Litewka J. 2021. Steroid Receptors in Breast Cancer: Understanding of Molecular Function as a Basis for Effective Therapy Development. *Cancers*. 13(19): 4779.
- Kurmi B D, Paliwal R, Paliwal S R. 2020. Dual cancer targeting using estrogen functionalized chitosan nanoparticles loaded with doxorubicin-estrone conjugate: A quality by design approach. *Int. J. Biol. Macromol*. 164: 2881–2894.
- Mahalakshmi N, Parthasarathy M. 2023. Growth, structural, spectroscopic, DFT calculations, *in silico* biological analysis of glycine methyl ester hydrochloride (GMEHCl) against human estrogen receptor. *Chem. Phys. Impact*. 7: 100303.
- Matsuzaki Y, Honda A. 2006. Dehydroepiandrosterone and Its Derivatives: Potentially Novel Anti-Proliferative and Chemopreventive Agents. *Curr. Pharm. Des*. 12(26): 3411–3421.
- Michalak M, Lach M S, Antoszczak M, Huczynski A, Suchorska W M. 2020. Overcoming Resistance to Platinum-Based Drugs in Ovarian Cancer by Salinomycin and Its Derivatives-An In Vitro Study. *Molecules*. 25(3): 537.
- Navacchia M L, Marchesi E, Perrone D. 2020. Bile Acid Conjugates with Anticancer Activity: Most Recent Research. *Molecules*. 26(1): 25.
- Nikolic A R, Petri E T, Klisuric O R, Celic A S, Jakimov D S, Djurendic E A, Penov Gasi K M, Sakac M N. 2015. Synthesis and anticancer cell potential of steroidal 16,17-seco-16,17a-dinitriles: Identification of a selective inhibitor of hormone-independent breast cancer cells. *Bioorg. Med. Chem*. 23(4): 703–711.
- Osuji I J, Vera-Bolanos E, Carmody T J, Brown E S. 2010. Pregnenolone for cognition and mood in dual diagnosis patients. *Psychiatry Res*. 178(2): 309–312.
- Pereira de Jesus-Tran K, Cote P, Cantin L, Blanchet J, Labrie F, Breton R. 2006. Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity. *Protein Sci*. 15(5): 987–999.
- Rocha-Roa C, Cortes E, Cuesta S A, Mora J R, Paz J L, Flores-Sumozza M, Marquez E A. 2023. Study of potential inhibition of the estrogen receptor α by cannabinoids using an *in silico* approach: Agonist vs antagonist mechanism. *Comput. Biol. Med*. 152: 106403.
- Savic M P, Skoric D, Kuzminac I Z, Jakimov D S, Kojic V V, Rarova L, Strnad M, Djurendic E A. 2020. New A-homo lactam D-homo lactone androstane derivative: Synthesis and evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities *in vitro*. *Steroids*. 157: 108596.
- Shiau A K, Barstad D, Loria P M, Cheng L, Kushner P J, Agard D A, Greene G L. 1998. The Structural Basis of Estrogen Receptor/Coactivator Recognition and the Antagonism of This Interaction by Tamoxifen. *Cell*. 95(7): 927–937.
- Sreenatha V, Srinivasa S M, Rajendra Prasad K. 2022. Design, synthesis, bioevaluation, DFT, docking, and molecular dynamic simulation for selected novel 1,3,4-Oxadiazole-indole derivatives hybrid against estrogen receptor alpha. *J. Mol. Struct*. 1269: 133789.
- Trott O, Olson A J. 2009. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem*. 31(2): 455–461.
- Trouillas P, Corbiere C, Liagre B, Duroux J L, Beneytout J L. 2005. Structure–function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin. *Bioorg. Med. Chem*. 13(4): 1141–1149.
- Xu L, Xu D, Li Z, Gao Y, Chen H. 2019. Synthesis and potent cytotoxic activity of a novel diosgenin derivative and its phytosomes against lung cancer cells. *Beilstein J. Nanotechnol*. 10: 1933–1942.
- Xu Z, Zhang T, Prinyawiwatkul W, Samuel Godber J. 2005. Capabilities of different cooking oils in prevention of cholesterol oxidation during heating. *is J. Am. Oil Chem. Soc*. 82(4): 243–248.
- Yu K H, Lee T L M, Wang C S, Chen Y J, Re C, Kou S C, Chiang J H, Kohane I S, Snyder M. 2018. Systematic Protein Prioritization for Targeted Proteomics Studies through Literature Mining. *J. Proteome Res*. 17(4): 1383–1396.



Oleaster leaf extract: a potential environmentally friendly inhibitor for mild steel

Demet Özkır^{1*} 

¹Niğde Ömer Halisdemir University, Faculty of Arts & Sciences, Department of Chemistry, Niğde, 51240, Türkiye

*Corresponding author : dozkir@ohu.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-8096-5755>

Received : 25/01/2024
Accepted : 03/03/2024

To Cite / Atf için: Özkır D. 2024. Oleaster leaf extract: a potential environmentally friendly inhibitor for mild steel. Eurasian J Bio Chem Sci, 7(1):20-25 <https://doi.org/10.46239/ejbc.1425801>

Abstract: In this research, the potential of *Elaeagnus angustifolia* tree leaf extract as a green corrosion inhibitor for mild steel in hydrochloric acid solution was examined. The stock concentration of the aqueous extract was determined to be 0.38% (w/v). Other experimental solutions were created by diluting four different extract concentrations in aggressive solution. Experimental measurements, including linear polarization (LPR), electrochemical impedance spectroscopy (EIS), and semi-logarithmic current potential curves by Tafel extrapolation method, were employed to validate the corrosion inhibition effects of the plant leaf extract at varying concentrations. Notably, oleaster leaf extract demonstrated a corrosion protection of over 90% for 0.018% w/v concentration on the mild steel, attributed to its abundance in secondary metabolites such as polyphenols and flavonoids. The atomic force microscopy (AFM) surface maps provide robust evidence for the electrochemical measurement data.

Keywords: *Elaeagnus angustifolia*, Environmentally-friendly inhibitor, Acidic corrosion, AFM.

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

Corrosion is an inherent and independent process wherein pure metals and their alloys undergo transformation into various stable forms, such as sulfides, oxides, hydroxides, and more. This occurs through chemical and/or electrochemical reactions with the surrounding environments (Singh et al., 2016a; Verma et al., 2018). Corrosion poses a detrimental threat to the assets of various traffic and railway bridges, buildings, industries as well as households. Due to its correlation with significant economic and safety losses, corrosion stands as a critical issue that demands attention from scientists and engineers engaged in the field of corrosion discipline and engineering worldwide (Haque et al., 2017). Numerous corrosion prevention methods have been developed, among which the use of green corrosion inhibitors has gained popularity as one of the most accessible and economical approaches. This is attributed to their ease of access and application, as well as their high effectiveness even at relatively low concentrations (Singh et al., 2016b; Ramezanzadeh et al., 2015).

Indeed, the use of conventional corrosion inhibitors is currently constrained as a result of the growing emphasis on “green chemistry” in the realms of engineering, technology,

and science. “Green chemistry” is indeed a discipline of scientific and technological exploration that operates on a series of principles with the primary goal of minimizing the release of environmentally harmful substances into the surroundings. This approach entails both the design and application of chemicals that are ecofriendly (Mohammadinejad et al., 2016). The consideration given to the development of green corrosion inhibitors has also extended to the utilization of various plant extracts, pharmaceuticals, and ionic liquids. Plants exhibit a distinctive ability to transform solar energy into life-sustaining organic compounds like carbohydrates through the procedure of photosynthesis (Alibakhshi et al., 2018; El-Hajjaji et al., 2018). They also serve as a natural source for numerous raw materials, including fruits, wood, vegetables, oils, dyes, and resins, which have various commercial applications in our everyday lives.

Elaeagnus angustifolia L., the effect of which was investigated in this study, is a deciduous shrub or small tree with a rich botanical history, habitually referred to as Russian olive, Persian olive or Wild olive. With distinctive silvery-green foliage and small fragrant flowers, *Elaeagnus angustifolia* has not only captivated the attention of botanists but also played a significant role in various cultural and ecological contexts (Zhang et al., 2023).

Elaeagnus angustifolia, a member of the Elaeagnaceae family, stands out for its remarkable adaptability, thriving across a diverse array of environmental conditions. As the adverse effects of traditional corrosion inhibitors become more apparent, there is a growing emphasis on sustainable alternatives, particularly those aligned with the principles of “green chemistry”. In this context, natural plant extracts have emerged as promising candidates for corrosion inhibition.

This study delves into the potential of *Elaeagnus angustifolia* plant extract as a green corrosion inhibitor for mild steel in acidic environment. *Elaeagnus angustifolia*, also known as Oleaster, is a deciduous shrub renowned for its adaptability and unique biochemical composition. The investigation focuses on the inhibitory effects of the plant extract on mild steel corrosion, exploring its efficiency, mechanism, and viability as an eco-friendly alternative. This research is notable as there is no previous study in the literature demonstrating the utilization of oleaster species' leaf extract as an inhibitor to impede metallic corrosion. This study also aims to provide a different perspective on the developing capacity of this plant leaf extract as an acidic environment green inhibitor for the first time.

2. Materials and Method

2.1. The aqueous extract solutions of *Elaeagnus angustifolia* leaves

A quantity of approximately 15 g of dried *Elaeagnus angustifolia* leaf (Figure 1) was placed into a 250 mL reaction flask and subjected to reflux for 24 hours with the addition of sufficient distilled water. Following the 24-hour reflux process, the extract was filtered, resulting in an approximate volume of 180 mL with an orange colour. The concentration of the stock solution derived from *Elaeagnus angustifolia* leaf was determined to be 0.380% (w/v). Various other concentrations were prepared by dilution from this stock solution.



Fig. 1 The photograph of dried *Elaeagnus angustifolia* leaves

After preparing the stock solution, the concentrations employed for electrochemical experiments were varied, ranging from the highest concentration to the lowest at 0.18%, 0.09%, 0.05%, and 0.02% (w/v), respectively. Figure 2 illustrates a schematic reflux procedure of *Elaeagnus angustifolia* leaf to enhance the clarity of the study. Conducting experiments in a 1.0 M HCl (hydrochloric acid) solution, known for its aggressive nature, enables the examination of electrochemical behaviour.

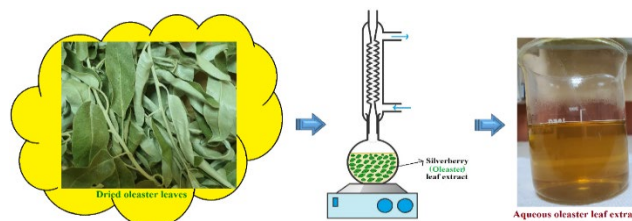


Fig. 2 Schematic of *Elaeagnus angustifolia* leaf extraction procedure

2.2. Preparation of materials

The chemical composition of mild steel, whose corrosion behaviour was studied as a working electrode, is presented in Table 1. These electrodes were introduced into a cylindrical mould that contained polyester, the mild steel surface area in communication with the electrolyte solution was 0.5024 cm². Before being put into use, the test electrodes underwent polishing using sandpaper with grits of 150, 600, and 1000. Afterward, the electrode surfaces were meticulously cleansed with distilled water and acetone. A three-electrode system was used in experiment measurements. The initial electrode employed was the mild steel as working electrode. The second electrode, functioning as the counter electrode, was composed of a platinum plate with a surface area of 2.0 cm². The final electrode employed was Ag/AgCl (3.0 M KCl), utilized as the reference electrode. All potentials documented in this investigation are calibrated with respect to this electrode.

Table 1 The chemical composition of the mild steel electrodes

Element	%	Element	%	Element	%
(C)	0.08400	(Si)	0.10200	(Mn)	0.40900
(P)	0.01100	(S)	0.01900	(Cr)	0.06030
(Mo)	0.01040	(Ni)	0.07890	(Al)	Trace
(Co)	0.00198	(Cu)	0.21700	(Nb)	0.00222
(Ti)	Trace	(V)	0.01100	(W)	Trace
(Pb)	Trace	(Sn)	0.01620	(Sb)	Trace
(Fe)	Remain				

EIS, LPR and Tafel extrapolation experiments were used to try-out the anti-corrosion property of *E. angustifolia* leaf extract for mild steel in HCl environment via the CHI660B electrochemical workstation. Throughout the open circuit potential ($E_{ocp}=E_{corr}$), the mild steel electrodes were soaked in the testing solution for 1h at 298 K until the iron surface extends a temporary stable state. When conducting EIS measurement, the starting potential was a balanced E_{ocp} value, and the method frequency limit was from 100000 Hz to 0.005 Hz with 5.0 mV amplitude signal. The LPR limit of the polarization curve is $E_{ocp} - 0.010$ V to $E_{ocp} + 0.010$ V and the potentiodynamic polarization by Tafel extrapolation method were documented at cathodic potential of -0.350 V and anodic potential of +0.350 V with reference to E_{corr} , respectively. This procedure was executed at a scanning rate of 1.0 mV s⁻¹. Surface survey was seized over the course of 1h in an electrolyte HCl solution, both with and without *E.*

angustifolia leaf extract, utilizing the AFM technique (Veeco Multimode 8 Nanoscope 3D model).

3. Results and Discussion

3.1. EIS, LPR and Potentiodynamic polarization findings

EIS measurement is appropriate for quickly, accurately, and efficiently gathering data on metal corrosion rates. It can be efficiently employed to evaluate the inhibitor under investigation's anti-corrosion characteristics (Tan et al., 2021). As EIS is conducted using alternating current, it is recognized for its non-damaging effect on the metal surface. The inhibitory effect of *E. angustifolia* leaf extract on the iron surface, characterized by a green inhibitory impact, was examined using EIS, LPR, and potentiodynamic polarization methods during a 1h immersion time at 298 K across four (0.02%-0.18% w/v) concentrations. In this process, two sets of electrical equivalent circuit models were studied; Figure 3 for aggressive 1.0 M HCl and Figure 4 for the extract solutions. The equivalent circuits for the corrosion and inhibition processes were derived from the EIS data with the assistance of Zview2 software.

In Figures 3 and 4, notable distinctions between the two proposed circuits are apparent. Especially in solutions that contain *E. angustifolia* leaf extract, a clear inhibitor film develops on the mild steel surface, leading to a concurrent rise in resistance. Figure 4 offers a more lucid understanding, depicting that the introduction of *E. angustifolia* leaf extract in different concentrations to the acidic solution results in a decrease in mild steel electrode corrosion. It is performed as the *E. angustifolia* leaf extract adheres to the mild steel surface, forming a preventive film layer that efficiently impedes corrosion. Furthermore, the impedance diagrams in Figure 4 clearly illustrates the augmented diameters of the capacitive loops in direct correlation with the enhance in *E. angustifolia* leaf extract concentration (Mert and Doğru Mert, 2023).

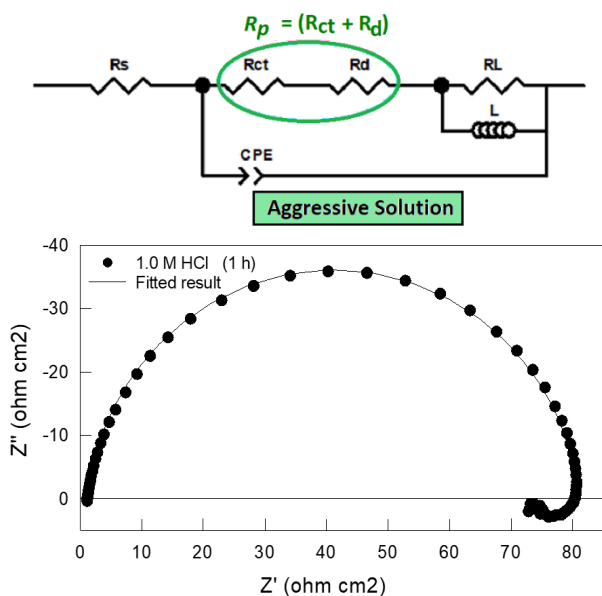


Fig. 3 Electrical circuit recommended and impedance diagram in aggressive solution for 1h

The relevant experiment parameters are succinctly presented in Table 2. The impedance plots exhibit two distinct frequency regions: the high-frequency region corresponds to the diffuse layer (R_d) and charge transfer (R_{ct}) in the corrosion exposure process (Karazehir et al., 2022). The low-frequency field is the locus of inhibition, controlled by the film resistance (R_f) that develops on the mild steel surface, originating from the oleaster leaf extract. Moreover, two constant phase elements ($CPEs$) are evident in the process of oleaster leaf extract solution. The first signifies the double-layer capacitance (CPE_{dl}), while the second corresponds to the capacitance of the film layer on the mild steel (CPE_{film}).

Upon scrutinizing the polarization resistance values obtained from the EIS and *LPR measurements in Table 2, it became apparent that the inhibition efficiency values ($\eta\%$ and $^*\eta\%$) significantly rose with the incorporation of the extract of *E. angustifolia* leaf into the aggressive solution. The inhibition efficiencies calculated from the findings of the EIS and LPR measurements ranged from 84.1% to 90.5% and 84.2% to 90.7%, respectively.

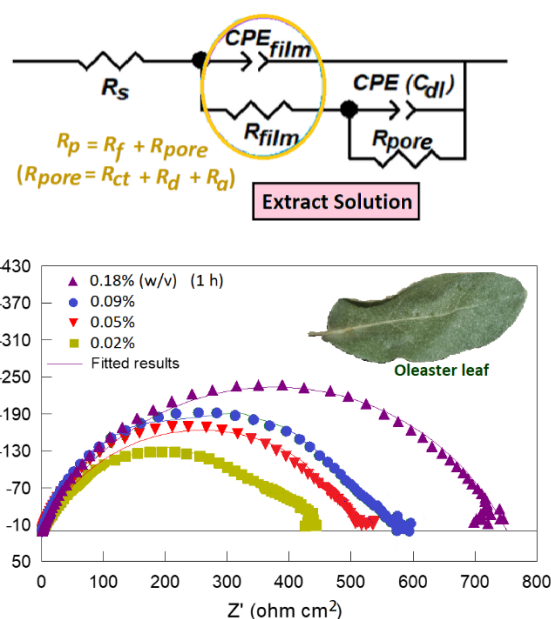


Fig. 4 Electrical circuit recommended and impedance curves in containing four concentrations of *Elaeagnus angustifolia* leaf extract

The CPE value obtained by the EIS method was determined as $110 \mu F/cm^2$ for the aggressive solution. This value gradually decreased with increasing extract concentration and was obtained as $60 \mu F/cm^2$ for the highest inhibitor concentration. The higher CPE in the inhibitor-free solution is explained by the higher number of diffused species in the absence of the inhibitor (Mert, 2022). In addition, the E_{corr} value of the aggressive medium was $-0.474 V$, and as oleaster leaf extract was added to the medium, it took on more negative potential values. The “ n ” value, which is described as the surface roughness coefficient in Table 2, also decreased as the inhibitor concentration increased. This is one of the indicators that the *E. angustifolia* leaf extract, whose inhibitory effect was examined, protects the mild steel by forming a film on its surface.

The **potentiodynamic polarization method by Tafel extrapolation, an alternative electrochemical technique, was outlined to determine the dissolution parameters of the mild steel, and the results are indicated in Table 2.

Figure 5 depicts the semi logarithmic current-potential curves of the test electrodes immersed in an HCl solution at 298 K, featuring four different concentrations of *E. angustifolia* leaf extract. It seems that as leaf extract is added to the electrolyte aggressive solution, current density values decrease and this decrease is more dominant in the cathodic curves (Nazlıgöl et al., 2022). In this case, the inhibitor can be described as functioning as a cathodic inhibitor on the mild steel in the acidic environment (Akkoç et al., 2023). In Table 2, the corrosion current density value (i_{corr}) were 265 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ in acidic environment, but decreased to 25 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ in the presence of highest

concentration of oleaster leaf extract, and the inhibition at this concentration was 90.6%.

There was no discernible difference between the solution with and without the inhibitor when assessing the cathodic Tafel constant ($-\beta_c$) values in Table 2. In this case, it was concluded that the hydrogen evolution mechanism was not affected by the oleaster leaf extract (Özkır, 2019). The results obtained by all three experimental methods were complementary and highly compatible with each other, and it was concluded that the adsorption of *E. angustifolia* leaf extract on the iron surface protected it by forming a film as a result of high inhibition. Moreover, since this extract does not have any toxic environmental effects, it is inevitable to be considered as a green inhibitor. EIS measurements were proved Tafel analysis.

Table 2 EIS, LPR and potentiodynamic polarization parameters from the experiments in solutions without and with *E. angustifolia* leaf extract

C (% w/v)	EIS							
	E_{corr} (V/Ag/AgCl)	R_s (Ωcm^2)	CPE		R_L (Ωcm^2)	L (H)	R_p (Ωcm^2)	η (%)
			($\mu\text{F cm}^{-2}$)	n				
<i>Elaeagnus angustifolia</i> leaf extract								
Blank	-0.474	1.2	110	0.94	8	4	72	-
0.02	-0.527	1.2	100	0.72	-	-	452	84.1
0.05	-0.530	1.2	90	0.71	-	-	525	86.3
0.09	-0.530	1.3	82	0.71	-	-	580	87.6
0.18	-0.536	1.2	60	0.70	-	-	755	90.5
<i>Elaeagnus angustifolia</i> leaf extract	*LPR							
	* E_{corr} (V/Ag/AgCl)		* R_p (Ωcm^2)				* η (%)	
Blank	-0.475		71				-	
0.02	-0.532		448				84.2	
0.05	-0.533		520				86.3	
0.09	-0.530		575				87.7	
0.18	-0.538		760				90.7	
<i>Elaeagnus angustifolia</i> leaf extract	**Potentiodynamic polarization							
	** E_{corr} (V/Ag/AgCl)		$-\beta_c$ (mV dec^{-1})		i_{corr} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)		** η (%)	
Blank	-0.475		108		265		-	
0.02	-0.536		107		43		83.8	
0.05	-0.536		99		37		86.0	
0.09	-0.533		105		34		87.2	
0.18	-0.542		104		25		90.6	

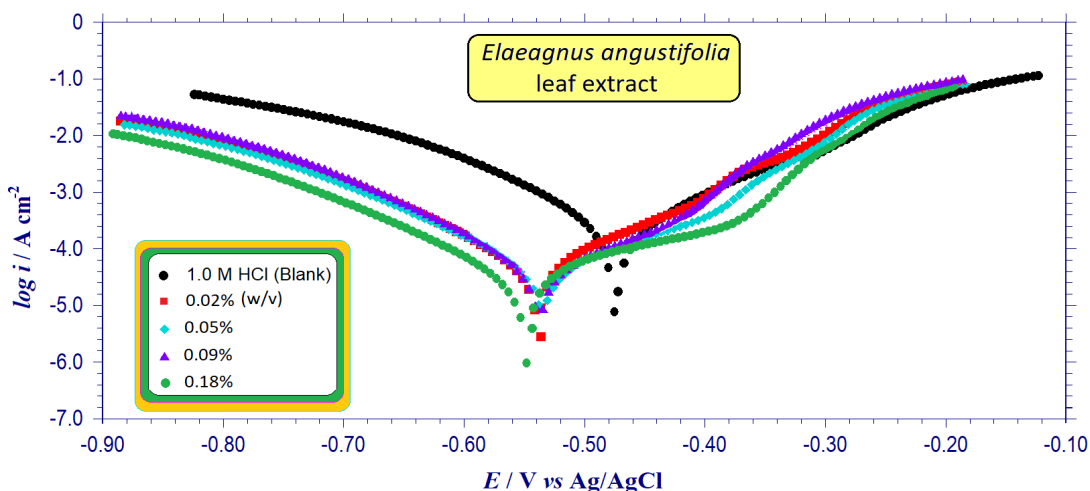


Fig. 5 Electrical circuit recommended and impedance diagram in aggressive solution for 1h

3.2. AFM analysis

The detailed analysis with AFM further reinforced understanding of the surface mechanism of *E. angustifolia*

leaf extract on mild steel. Figures 6 and 7 display three-dimensional images of the treated blank solution and 0.18% (w/v) extract solution for 1 hour.

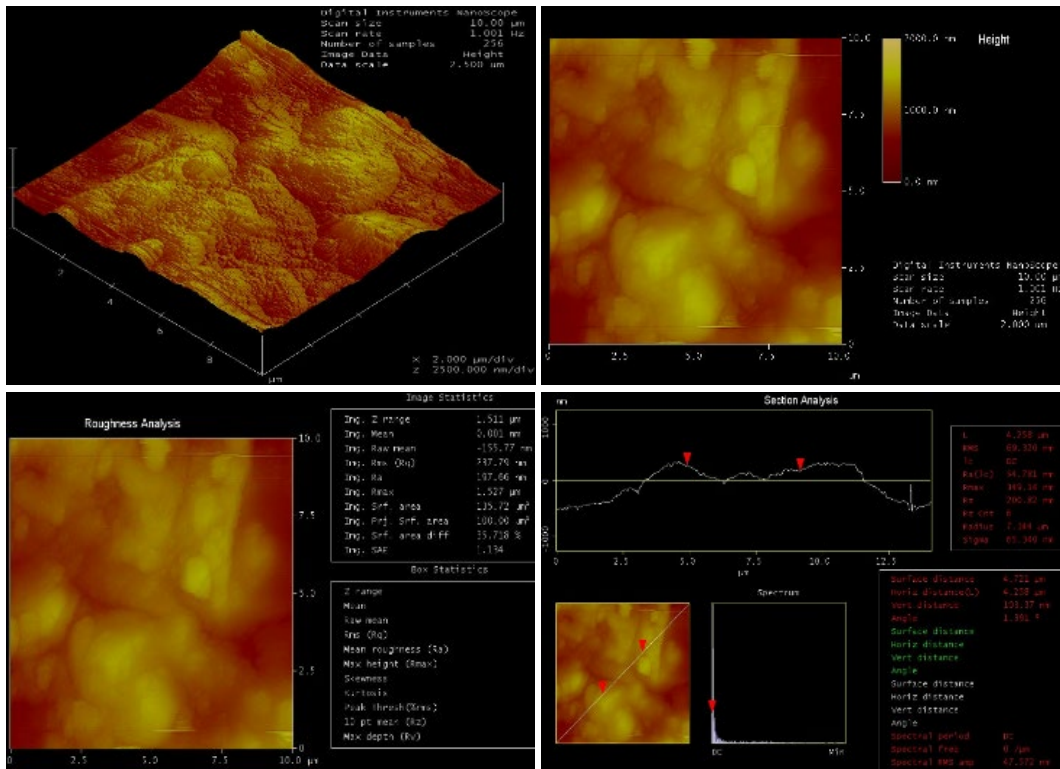


Fig. 6 AFM images of the mild steel in aggressive HCl solution for 1 h exposure

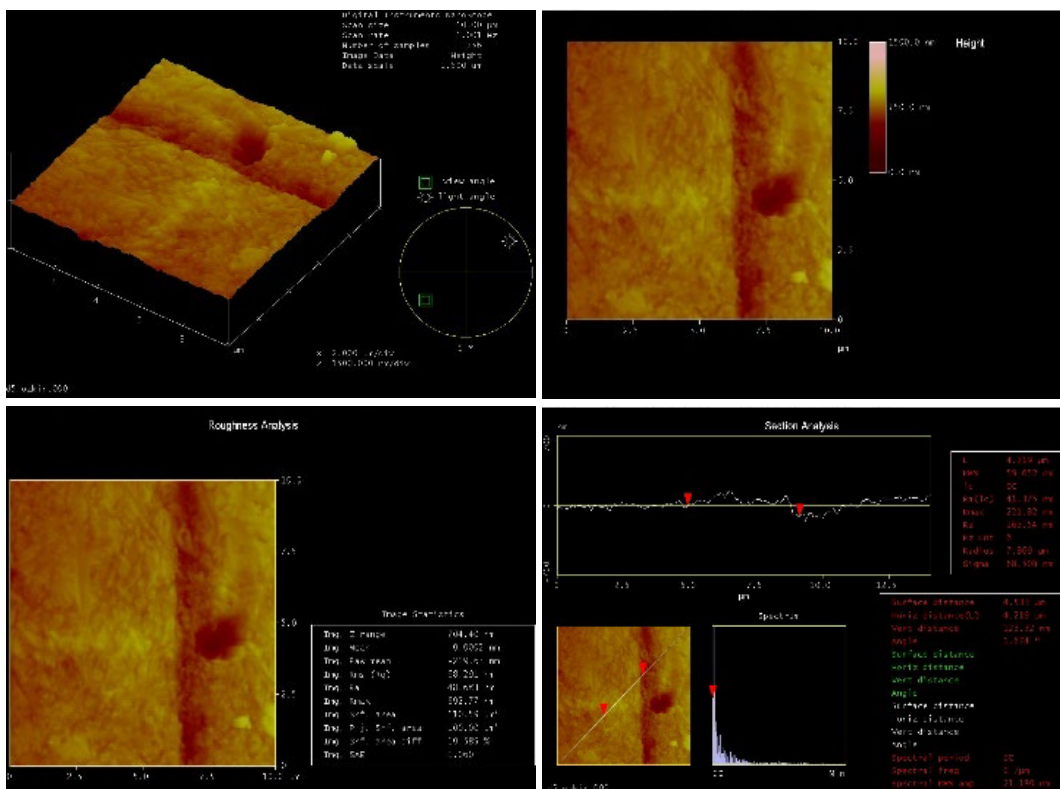


Fig. 7 AFM images of the mild steel with 0.18% (w/v) *E. angustifolia* leaf extract in HCl solution for 1 h exposure

Average surface roughness parameter (R_a) value for blank solution was determined as 197.66 nm. When the highest concentration of oleaster leaf extract was added to the solution, this value became 48.683 nm. The significant decrease in the average surface roughness value is further evidence that the green inhibitor used reduces the roughness of the metal in the acidic environment and that the inhibitor protects the surface of the mild steel. The results of the AFM analysis and electrochemical experimental measurements are quite consistent.

4. Conclusion

This paper is of great importance as it is the first application of the effect of aqueous *Elaeagnus angustifolia* leaf extract, from the Elaeagnaceae family, as a green and environmentally friendly inhibitor on the corrosion behavior of iron electrode in hydrochloric acid solution. The findings obtained with the three different methods applied were quite compatible with the surface analysis results.

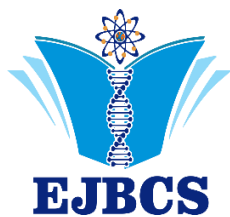
The preservation of mild steel corrosion in 1 M HCl by the extract of *Elaeagnus angustifolia* leaves, acting as a green inhibitor, underscores the protective role of secondary metabolites present within the plant. The observed corrosion inhibition can be attributed to the rich composition of bioactive compounds inherent to oleaster leaves. These secondary metabolites, such as polyphenols, flavonoids, and tannins, are known for their anti-oxidative features, forming a resilient protective layer on the steel surface. The green inhibitor's efficacy in hindering corrosion emphasizes the potential of *Elaeagnus angustifolia* leaf extract as a promising and eco-friendly solution for corrosion mitigation in acidic environments.

Authors' contributions: DÖ, obtaining data & principle investigation & experimental measurements & editing & writing.

Conflict of interest disclosure: The author declares no conflict of interest on the written article.

References

- Akkoç S, Özkır D, Başaran E, Kaya S, Berisha A. 2023. A combined experimental and theoretical approach effect of a benzimidazolium salt as a new corrosion inhibitor on mild steel in HCl solution. *Ionics*, 29:3813–3827
- Alibakhshi E, Ramezanzadeh M, Bahlakeh G, Ramezanzadeh B, Mahdavian M, Motamedi M. 2018. Glycyrrhiza glabra leaves extract as a green corrosion inhibitor for mild steel in 1 M hydrochloric acid solution: experimental, molecular dynamics, Monte Carlo and quantum mechanics study. *J Mol Liq*. 255:185–198
- El-Hajjaji F, Messali M, Aljuhani A, Aouad M, Hammouti B, Belghiti M, Chauhan D, Quraishi M. 2018. Pyridinium-based ionic liquids as novel and green corrosion inhibitors of carbon steel in acid medium: electrochemical and molecular dynamics simulation studies. *J Mol Liq*. 249:997–1008
- Haque J, Srivastava V, Verma C, Quraishi M. 2017. Experimental and quantum chemical analysis of 2-amino-3-((4-((S)-2-amino-2-carboxyethyl)-1H-imidazol-2-yl)thio) propionic acid as new and green corrosion inhibitor for mild steel in 1 M hydrochloric acid solution. *J Mol Liq*. 225:848–855
- Karazehir T, Mert ME, Doğru Mert B. 2022. Corrosion prevention of mild steel in acidic medium by 2-Pyrrolidin-1-yl-1,3-thiazole-5-carboxylic acid: Theoretical and experimental approach. *J Indian Chem Soc*, 99:100642
- Mert ME & Doğru Mert B. 2023. Karbon Ayak İzinin Azaltılması için Korozyon İnhibitörü Olarak Son Kullanma Tarihi Geçmiş Depakin Tabletın İncelenmesi. *Kadirli Uygulamalı Bilimler Fakültesi Dergisi*, 3(1):56–66
- Mert ME. 2022. 2-etil-4-metil-1,3-tiyazol-5-karboksilik Asitin Korozyona Karşı İnhibisyon Etkisinin İncelenmesi. *BŞEÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 9(2):1110-1121
- Mohammadinejad R, Karimi S, Irvani S, Varma RS. 2016. Plant-derived nanostructures: types and applications. *Green Chem*. 18:20–52
- Nazlıgül H, Güllü E, Mert ME, Doğru Mert B. 2022. Investigation of Inhibition Performance of Epdantoin for Mild Steel Protection in HCl Solution: Electrochemical and Quantum Theoretical Approaches. *Tr J Nature Sci*. 11(4):70-78
- Özkır D. 2019. A Newly Synthesized Schiff Base Derived from Condensation Reaction of 2,5-dichloroaniline and benzaldehyde: Its Applicability through Molecular Interaction on Mild Steel as an Acidic Corrosion Inhibitor by Using Electrochemical Techniques. *J Electrochem Sci Technol*. 10(1):37–54
- Ramezanzadeh B, Vakili H, Amini R, 2015. The effects of addition of poly(vinyl)alcohol (PVA) as a green corrosion inhibitor to the phosphate conversion coating on the anticorrosion and adhesion properties of the epoxy coating on the steel substrate, *Appl Surf Sci*. 327:174–181
- Singh P, Srivastava V, Quraishi M. 2016a. Novel quinoline derivatives as green corrosion inhibitors for mild steel in acidic medium: electrochemical, SEM, AFM, and XPS studies. *J Mol Liq*. 216:164–173
- Singh P, Makowska-Janusik M, Slovinsky P, Quraishi M. 2016b. Nicotinonitriles as green corrosion inhibitors for mild steel in hydrochloric acid: electrochemical, computational and surface morphological studies. *J Mol Liq*. 220:71–81
- Tan B, He J, Zhang S, Xu C, Chen S, Liu H, Li W. 2021. Insight into anti-corrosion nature of *Betel* leaves water extracts as the novel and eco-friendly inhibitors. *J Colloid Interface Sci*. 585:287–301
- Verma C, Ebenso EE, Bahadur I, Quraishi MA. 2018. An overview on plant extracts as environmental sustainable and green corrosion inhibitors for metals and alloys in aggressive corrosive media. *J Mol Liq*. 266:577–590
- Zhang J-N, Ma M-H, Ma X-L, Ma F-L, Du Q-Y, Liu J-N, Wang X-C, Zhao Q-P, Yu Y-J, She Y. 2023. A comprehensive study of the effect of drying methods on compounds in *Elaeagnus angustifolia* L. flower by GC-MS and UHPLC-HRMS based untargeted metabolomics combined with chemometrics. *Ind Crop Prod*. 195:116452



Molecular identification of protease producer ORSK-4 strain and determination of optimum enzyme production conditions

Karcan Işık¹, Ümit Yırtıcı², Belgin Güldeste³, Aysun Ergene^{4*}

^{1,3,4*}Kırıkkale University, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Biology, Kırıkkale, Turkey

²Kırıkkale University, Department of Medical Laboratory, Kırıkkale, Turkey

*Corresponding author: ergene@kku.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0003-4104-5697>

Received : 07/02/2024
Accepted : 22/03/2024

To Cite / Atıf için: Işık K, Yırtıcı Ü, Güldeste B, Ergene A. 2024. Molecular identification of protease producer ORSK-4 strain and determination of optimum enzyme production conditions. Eurasian J Bio Chem Sci, 7(1):26-40 <https://doi.org/10.46239/ejbc.1433566>

Abstract: A microorganism resistant to high temperatures and producing alkaline proteases was isolated from soil samples from a protein-rich region (Kırıkkale/Yahşihan). This isolate, with high protein production, was identified as ORSK-4 by determining its morphological and biochemical properties using the 16s rRNA molecular approach and the Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) technique employed in strain differentiation. The optimum enzyme production conditions of the strain ORSK-4 were found to be the enzyme media, 3 days of incubation, 27.0 °C, and pH 7.0. Different components were utilized to determine the effect of changing the medium content on enzyme activity. Under the optimal production conditions determined in this way, the enzyme activity of ORSK-4 was found to be higher than that of some ATCC reference *Bacillus* species. To purify the extracellular protease of ORSK-4, precipitation with ammonium sulfate (30% and 80%), dialysis, and DEAE ion exchange chromatography were performed. SDS-PAGE analysis determined the molecular weight of the purified enzyme as approximately 30 kDa. Although the enzyme showed activity at various pH ranges, it showed its maximum activity when increased up to pH 9.0. In conclusion, the stability of the obtained alkaline protease enzyme under different conditions shows that it can be used in industrial and environmental applications.

Keywords: *Bacillus*, enzyme characterization, molecular identification, protease, purification,

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

Proteases (proteinases or peptidases) catalyze the hydrolysis of peptide bonds. They represent one of the three largest groups of industrial enzymes and account for approximately 60% of the total enzyme sales worldwide (Rao et al 1998). Proteases are widely used in detergents, the leather industry, medical diagnostics, silver X-ray films, and stickiness removal in silk, food, and feed industries. Therefore, many companies have started producing proteases commercially (Solanki et al. 2021).

The primary consideration when isolating enzymes on an industrial scale for commercial purposes is to reduce the cost of production concerning the value of the end product (Adrio and Demain 2014). From this perspective, bacterial proteases are one of the best options. Proteases, mostly produced extracellularly and efficiently by bacteria, seem more suitable for industrial applications because they are thermostable and active in a wide pH range (Adrio and Demain 2014).

Although most alkaliphilic microorganisms, which are more preferred in protease production, produce alkaline proteases, the interest is limited to the microorganisms that produce large amounts of enzymes, and the microorganisms used to obtain proteases are toxic and non-pathogenic (Adrio and Demain 2014). These organisms with optimal growth conditions are essential for increasing enzyme production. The culture conditions that promote the production of these proteases have been found to differ significantly from those that promote cell growth (Mason and Joyce 2011). Technical media containing high concentrations (100-150 g dry weight/liter) of complex carbohydrates, proteins, and other media components have produced industrial alkaline proteases (Asha and Palaniswamy 2018). The fermentation medium and production conditions should be optimized to develop an economically viable technology, and the yields of alkaline proteases should be improved (Sharma et al. 2017).

Alkaline proteases are indispensable enzymes hence ubiquitous in nature. They are isolated from various sources by surface plating on an alkaline medium and subsequent screening for the desired characteristics (Sharma et al. 2017).

From the very beginning, these enzymes have been produced by using *Bacillus* species, starting with *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus licheniformis* (Zhang et al. 2022). Each organism or strain has specific conditions for maximum enzyme production (Sharma et al. 2017). Therefore, various aspects must be optimized for the strain to reach its maximum enzyme production capacity. In addition, identifying the strain is important for optimizing the production conditions. In this respect, a simple, fast and cost-effective microbial method is preferred for strain identification (for example, ARDRA).

This study isolated and identified microorganisms by taking samples from alkaline, protein-rich soil (Kırıkkale/Yahşihan). It aims to extract and purify the protease enzyme obtained by determining the optimum culture and enzyme production conditions for the microorganisms.

2. Materials and Method

Study area: Collected from the Yahşihan district of the province of Kırıkkale, microorganisms used in this study were isolated from alkaline, protein-rich soil (39°52'36.6"N and 33°26'25.5"E). Two soil samples were collected in total, one from the soil surface and one from the soil surface at a depth of 2 cm. Studies on the protease enzyme produced by the isolated microorganism were carried out after it was determined to be the best-suited protease-producing microorganism from the soil sample. The circumstances under which the acquired protease enzyme had the highest suitable activity were identified. Thus, the purified enzyme's applicability to the industry was evaluated.

2.1. Isolation, identification of isolates and biochemical tests

A location with a high concentration of proteins was identified to help identify the protease-producing bacterium, and soil samples from this stratum were collected and placed in sterile tubes. 1 g of dirt was serially diluted with 0.9% sterile saline. Singh et al. medium was modified to create the dilutions, and 0.1 ml of the material was added to this media by using the smear technique (Singh et al. 2001). The best isolates with various colony architectures and forming the biggest zone in proteolytic activity on skim-milk agar were chosen, purified, and stored at +4 °C for later use in Petri dishes left to incubate for 24 hours at 37°C. The macromorphological (gram staining, spore staining) and biochemical (IMVeC, starch hydrolysis, gelatin hydrolysis, catalase test) characteristics of the strain were determined.

2.2. Molecular identification of isolated microorganisms by 16S rRNA analysis and distinguishing microorganisms from one another with the ARDRA method

The strain was then identified by using molecular techniques (DNA isolation, 16S rRNA analysis, PCR, sequence analysis, ARDRA). Genomic DNA isolation of microorganisms was carried out by modifying the method of Cutting and Horn (Bron et al. 1990). After determining the nucleoid sequence of the 16S rRNA gene, it was amplified by Polymer Chain Reaction (PCR) with universal primers

27F(5'CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3') and 1492 R (5'CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'). Since PCR can be affected by many factors, the PCR products used to extract the nucleotide sequencing of 16S rRNA gene must be optimally synthesized. 5 different concentrations of MgCl₂ between 1 mM-2.33 mM and coupling temperatures between 50-55 °C were tested for PCR optimization. Sequence analysis of 16S rRNA gene amplified by PCR was carried out by MedSanTek company contracted under a service procurement. The obtained sequencing results were matched with the data on the 16S rRNA database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The Molecular Evolutionary Genetics Analysis 7 (MEGA7) program was used to determine the kinship relations with the results obtained. First, the data on the database and the nucleotide sequences of our samples were synchronized, the distance matrix was drawn by providing statistical reliability with these data, and the degree of closeness was determined by the neighbor-joining method. Although 16S rRNA analysis successfully determines the genera of microorganisms, differentiation at the species level is very difficult, especially for the genus *Bacillus*. ARDRA, a cutting method of 16S rRNA gene with restriction enzymes, was utilized to recognize the genus *Bacillus*, which is found very similar to the other microorganisms in 16S sequence analysis, and the differences between microorganisms were investigated. Three restriction enzymes (HaeIII (BsuRI), TaqI, and AluI) were used in ARDRA (Kurabachew et al. 2003).

2.3. Protease production medium and culture conditions of the isolate

A nutrient broth (N.B) medium was used to determine the optimum growth temperature and pH of the isolated isolate strain. The medium pH was adjusted to 5.0, 7.0, 9.0, and 12.0, and sowing was carried out. The cultured media were incubated at 17 °C, 27 °C, 37 °C, and 50 °C and the growth was checked on the first three days. After incubation, the growth density of the microorganism was measured in a microplate reader (Biotek, PowerWave XS2) set to 600 nm. For protease production, Gessesse et al. (1997) suggested that organic (peptone, yeast extract, casein, meat extract, gelatin, skim milk, urea, tryptone, soy flour) and inorganic components (NaCl, MgSO₄, CaCl₂, and K₂HPO₄, ((NH₄)₂SO₄), C₂H₇NO₂, NaNO₃, Ca (NO₃)₂) and their effects on enzyme activity were determined by changing their amounts (negative, 2.5-fold)

(Gessesse and Gashe 1997). Accordingly, the optimum growth media for the protease activity of the isolate was determined.

2.4. Enzyme production

At each step of the enzyme purification process, the protein concentration was measured by a modified Bradford method. The measurement of the protease activity was determined by modifying the method employed by Takami (Takami et al. 1989). This method used the supernatant part of the samples, whose incubation was completed in the appropriate medium, as the enzyme source. Through three repetitions, 0.5 mL of 50 mM Glycine-NaOH buffer containing 0.6% casein (pH 9.0) as a substrate were taken into 1.5 mL centrifuge tubes, and 0.1 mL of the previously prepared medium supernatant (enzyme source) was added. It was incubated at 37 °C for 20 minutes. Then, 0.5 mL of TCA solution was added, the tubes were turned upside down to stop the reaction and kept at room temperature for 30 minutes. Then, the tubes were centrifuged at 12000 rpm for 7 minutes to remove the excess substrate. After centrifugation, three repetitions were completed in 96 well plates; 25 µL of supernatant was taken, 125 µL of 0.5 M Na₂CO₃ and 25 µL of 1 N Folin-ciocalteu's phenol reagent was added, and it was kept in the dark at room temperature for 30 minutes. After 30 minutes, well plates were read in a microplate reader set to 660 nm, and the results were recorded by averaging the repetitions. Enzyme units (U/mL) were then determined by the amount of tyrosine released from the tyrosine standard curve (Kazan et al. 2005). The enzyme units (U/mL) were divided by the total protein content of the sample to determine the specific activity (mg/mL). While the specific activity was calculated as enzyme activity per mg of protein and expressed as units (U/mL), the sample activity was expressed as units (U/mL).

2.5. Determination of the molecular size of protease enzyme by enzyme purification and SDS-PAGE

As to ammonium sulfate precipitating, 30% and 80% ammonium sulfate precipitation was performed. 50 mM (pH 7.0) phosphate buffer was added to the precipitated sample and dissolved in the lowest volume. The pellets dissolved in phosphate buffer with 80% precipitation were added to the dialysis membranes, and dialysis was performed against the same buffer for 12 hours at +4 °C. 5 mL of DEAE-Sepharose ion exchange column material (DCL6B100 SIGMA) was taken, and 50 mL of 50 mM (pH 7.0) phosphate buffer was added to it. The column material was mixed thoroughly and became ready for use. The sample from the dialysis was loaded on the column, and by changing the salt density (10, 100 mM, 1 M), a 1.5 mL (approximately 32) fraction was obtained at a flow rate of 1 mL/min. SDS-PAGE electrophoresis was performed to determine the molecular size of the purified protease enzyme.

2.6. Enzyme characterization

2.6.1. Determination of the optimum operating temperature and the pH value of the enzyme

The effects of temperature (17-80 °C) and pH (7.0-12.0) on enzyme activity were analyzed at varying intervals.

2.6.2. Effects of metal ions, surfactants, inhibitors, detergents, organic solvents, oxidants, and different substrates on enzyme activity

Enzyme activity was measured by incubating all reaction mixtures in 50 mM Glycine-NaOH buffer having a pH of 9 and containing 0.1 mL enzyme source (media supernatant) and 0.5 mL 0.6% casein, for 20 min at 37 °C. +1 valent (LiCl, NaCl, KCl), +2 valent (Co(NO₃)₂, ZnSO₄, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, Sr(NO₃)₂, MnSO₄, Pb(NO₃)₂) at the concentrations of 2 mM and 10 mM, NiSO₄, SrCl₂, CuCl₂, MgSO₄, ZnNO₃, CaCl₂, MgCl₂) and +3 valence (Cr(NO₃)₃, AlCl₃, FeCl₃) metal salts were used. Serine protease inhibitor PMSF, Metalloprotease inhibitor EDTA, CuSO₄, and DPPH with final concentrations of 2 mM and 10 mM were used. 10% (v/v) and 25% (v/v) volumes of toluene, heptane, methanol, acetone, DMSO, ethanol, 2-propanol, hexane, acetonitrile, and benzene were used. 1% (v/v) and 5% (v/v) volumes of tween-80, Triton X-100, SDS and H₂O₂ were used. Gelatin, bovine serum albumin (BSA), ovalbumin, and soy flour were used as substrates.

2.7. Statistical analysis

All experiments were repeated three times. The results were expressed by adding standard deviation (SD) error bars on the graph. Differences between tested groups were determined by the Tukey test at p<0.05 after a one-way analysis of variance (ANOVA). Analyzes were performed using the R v.4.0.3 program.

3. Results

3.1. Isolation, prescreening of strains and biochemical properties

One of the six isolates (ORSK-4) that formed the largest zone in proteolytic activity in the preliminary screening was selected to be used in subsequent studies.

The microbiological and biochemical properties of the isolate are given in Table 1. Various biochemical tests are vital for the types of bacteria to be identified and characterized. For this purpose, biochemical properties of isolate ORSK-4 were found as (gram (+), spore (+), gelatin hydrolysis (+), catalase (+), starch hydrolysis (-), indol (-), methyl red (-), Voges-Proskauer (+), citrate (-)).

Table 1. Biochemical test results of the isolated microorganism

	Gram	Spore	Gelatin hyd.	Starch hyd.	Catalase
ORSK-4	+	+	+	-	+
	I. test	M.R. test	V.P. test	S. test	
	-	-	+	-	

(+) indicates positive result and (-) denotes negative result.

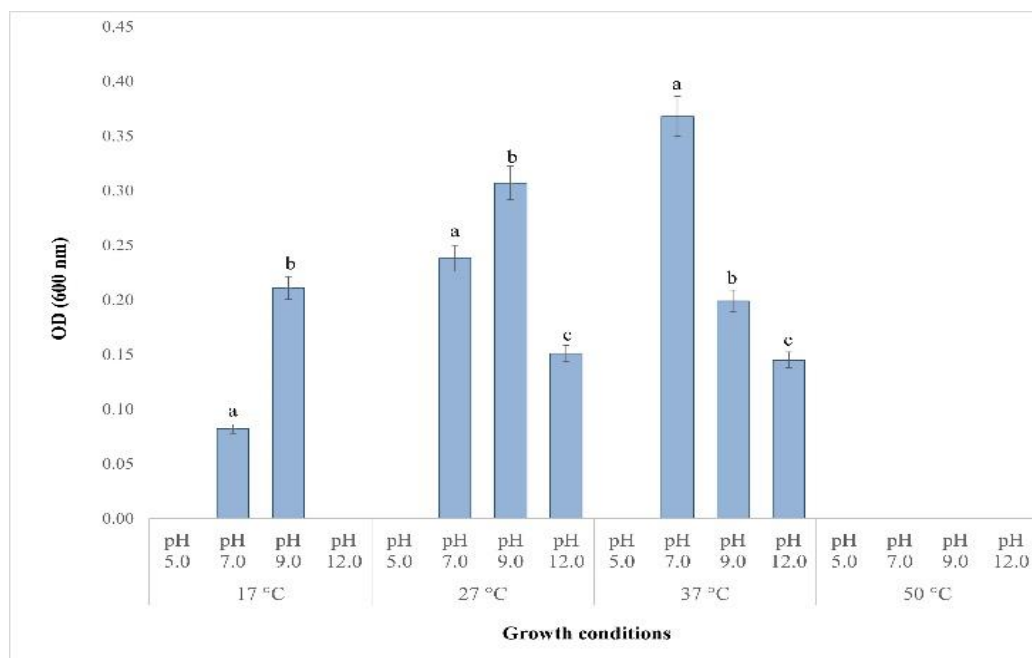


Fig. 1. Growth density of isolate ORSK-4 under different growing conditions. Different letters (a, b, c) on the graph indicate the significant differences for different pH values at the same temperature ($p < 0.05$).

3.2. Determination of isolate's optimal growth temperature and pH value

The optimum growth medium of isolate ORSK-4 was found to be 37 °C and pH 7.0. Growth densities of isolate ORSK-4 under different growth conditions are given in Figure 1.

3.3. Molecular identification of isolated microorganisms by 16S rRNA analysis and distinguishing microorganisms from each other with the ARDRA method

The images of the isolated chromosomal DNAs carried out in 1% agarose gel electrophoresis at 80 Volts for an hour are shown in Figure 2.

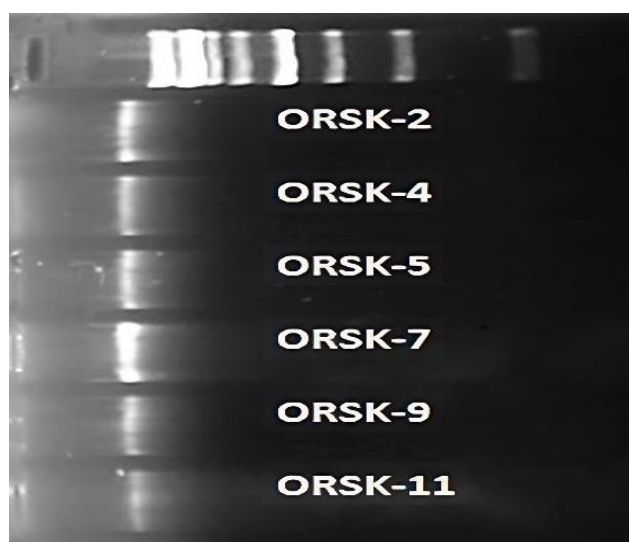


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of isolate ORSK-4

The optimum bonding temperature of isolate ORSK-4 was determined to be 50 °C (b), and the optimal final $MgCl_2$

concentration at 50 °C was 1.67 mM (a). Optimization results of the isolate's binding temperature and final $MgCl_2$ concentrations are given in Figure 3.

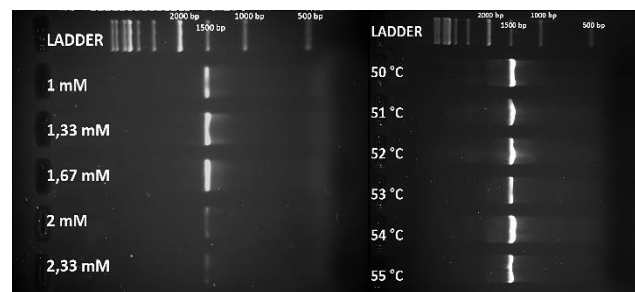


Fig. 3. Optimization results of the ORSK-4 binding temperature and final $MgCl_2$ concentrations

The nucleotide sequences of 14 different microorganism species obtained from NCBI 16S rRNA database together with the 16S rRNA sequence analysis result of the isolate ORSK-4 were aligned with each other in MEGA7 within the content of this study. According to the alignment results, the distance matrix was drawn by providing statistical reliability (bootstrap analysis with 1000 repetitions) (Figure 4). Evolutionary closeness levels were determined by drawing pedigrees with the neighbor-joining method using the distance matrix results (Figure 5). According to the aligned distance matrix results, the isolate ORSK-4 was found to be the closest relative of *Bacillus cereus* (accession number: NR_074540.1)

The 16S rRNA gene was PCR-amplified with primers 27F and 1492 R. It was revealed in the previous studies that this area includes approximately 1500 base pairs (Yu et al. 2012).

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ORSK-4														
NR_074540.1 <i>Bacillus cereus</i>	0.0411													
NR_114581.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	0.0418	0.0006												
NR_121761.1 <i>Bacillus toyonensis</i>	0.0418	0.0006	0											
NR_117414.1 <i>Bacillus marcorestinctum</i>	0.0432	0.0018	0.0012	0.0012										
NR_113991.1 <i>Bacillus pseudomycooides</i>	0.044	0.0036	0.0042	0.0042	0.0055									
NR_024697.1 <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	0.0453	0.0036	0.003	0.003	0.003	0.0073								
NR_113990.1 <i>Bacillus mycooides</i>	0.0453	0.0036	0.003	0.003	0.003	0.0073	0							
NR_116644.1 <i>Bacillus gaemokensis</i>	0.0482	0.0073	0.0067	0.0067	0.0067	0.0061	0.0073	0.0073						
NR_125530.1 <i>Bacillus manliponensis</i>	0.0531	0.0116	0.0122	0.0122	0.0135	0.0116	0.0153	0.0153	0.0166					
NR_074914.1 <i>Bacillus cytotoxicus</i>	0.0546	0.0129	0.0135	0.0135	0.0147	0.0104	0.0166	0.0166	0.0154	0.0135				
NR_133704.1 <i>Bacillus tianshenii</i>	0.066	0.0238	0.0244	0.0244	0.0245	0.0238	0.0264	0.0264	0.0265	0.027	0.027			
NR_041942.1 <i>Bacillus acidicola</i>	0.0674	0.0251	0.0257	0.0257	0.027	0.0225	0.029	0.029	0.0243	0.0303	0.0219	0.0324		
NR_025373.1 <i>Bacillus shackletonii</i>	0.068	0.0257	0.0263	0.0263	0.0276	0.0231	0.0296	0.0296	0.0249	0.0309	0.0218	0.0338	0.0042	
NR_118437.1 <i>Bacillus marisflavi</i>	0.0683	0.0258	0.0264	0.0264	0.0277	0.0231	0.0297	0.0297	0.025	0.0323	0.027	0.0278	0.0141	0.016

Fig 4. Distance matrix of ORSK-4 isolate

ARDRA is a commonly used method for the classification of the species (Panigrahi et al. 2019). This method was utilized to determine ORSK-4's similarities with and differences from *B.cereus* ATCC 10876 and *B. subtilis* ATCC 6633. 16S rRNA gene region of isolate ORSK-4

generated 3 bands (680, 240, and 180 base pairs) after cut by Alu I restriction enzyme, 4 bands (590, 480, 310, and 120 base pairs) after cut by Hae III restriction enzyme, and 3 bands (800, 560 and 140 base pairs) after cut by Taq I restriction enzyme (Figure 6a).

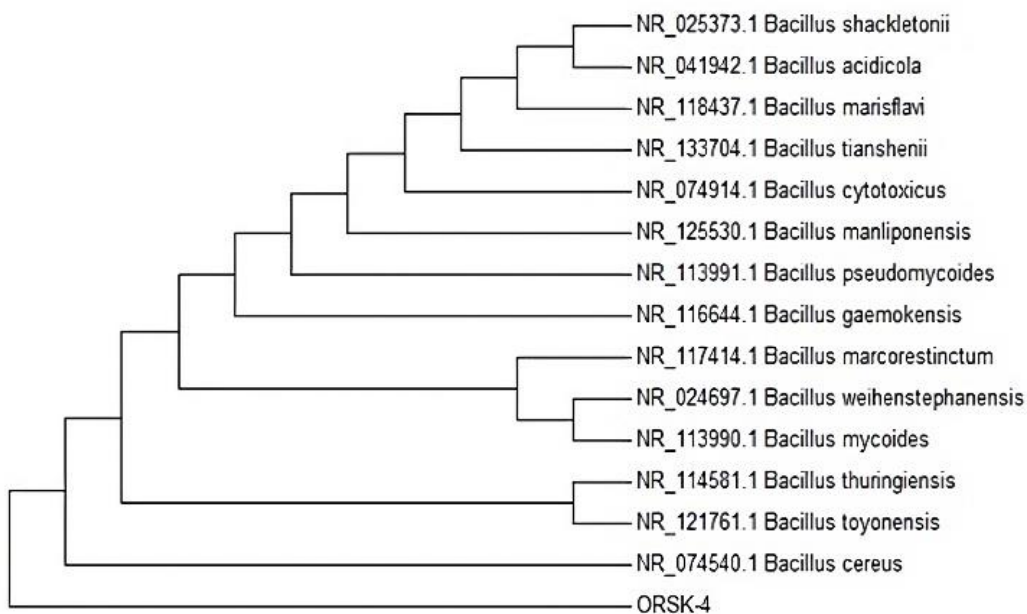


Fig. 5. Distance matrix results used to determine the pedigree of the isolate ORSK-4

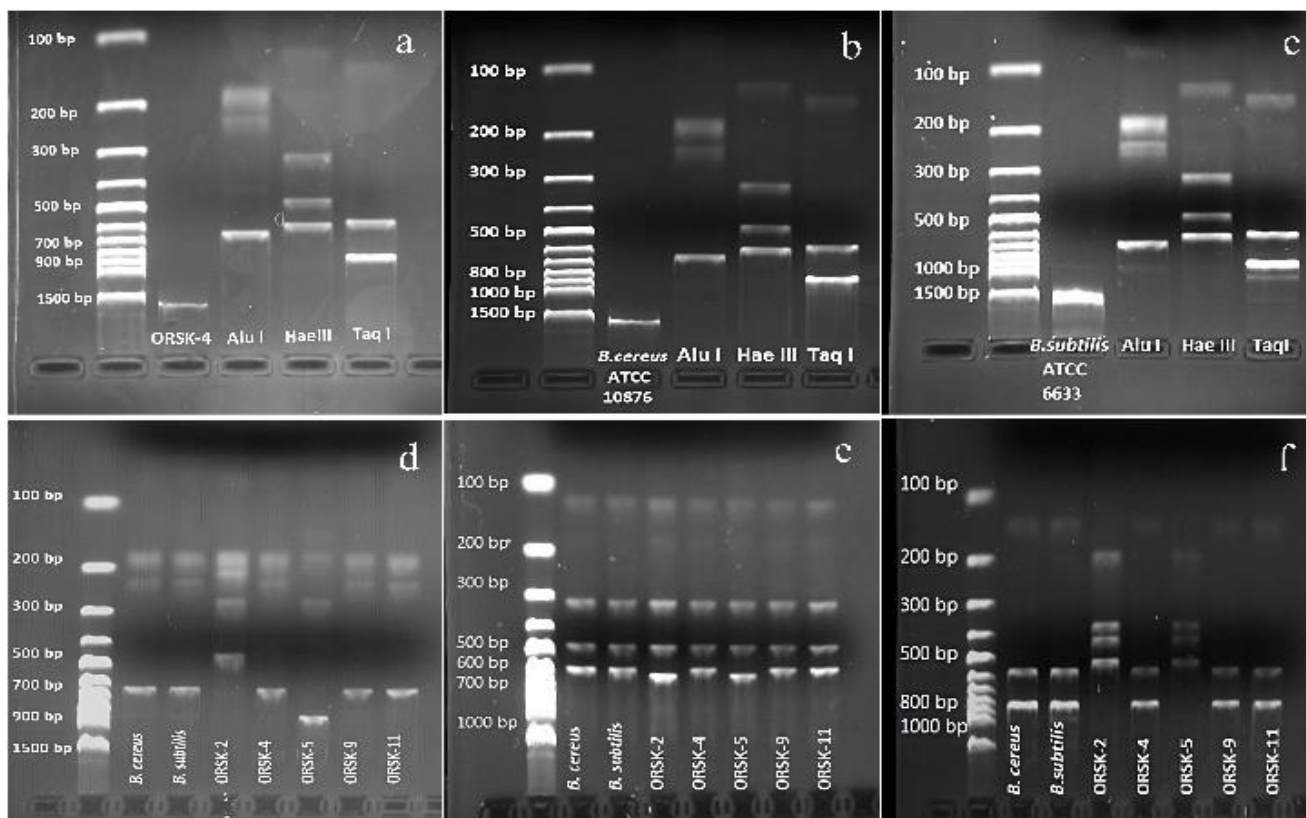


Fig. 6. a: ARDRA profile of ORSK-4 isolate cut by Alu I, Hae III and Taq I enzymes, b: ARDRA profile of *B. cereus* ATCC 10876 strain cut by Alu I, Hae III and Taq I enzymes cut, c: ARDRA profile of *B. cereus* ATCC 6633 strain cut by Alu I, Hae III and Taq I enzymes cut, d: ARDRA Profile of Alu I cleavage enzyme in reference strains and all isolates, e: ARDRA Profile of Hae III cleavage enzyme in reference strains and all isolates, f: ARDRA Profile of Taq I cleavage enzyme in reference strains and all isolates

16S rRNA gene region of *B. cereus* ATCC 10876 generated 3 bands (680, 240, and 180 base pairs) after cut by Alu I restriction enzyme, 4 bands (590, 480, 310, and 120 base pairs) after cut by Hae III restriction enzyme, and 3 bands (800, 560 and 140 base pairs) after cut by Taq I restriction enzyme (Figure 6b). 16S rRNA gene region of *B. subtilis* ATCC 6633 generated 3 bands (680, 240, and 180 base pairs) after cut by Alu I restriction enzyme, 4 bands (590, 480, 310, and 120 base pairs) after cut by Hae III restriction enzyme, and 3 bands (800, 560 and 140 base pairs) after cut by Taq I restriction enzyme (Figure 6c).

As a result of the cleavage of 16S rRNA gene regions of reference strains and isolate with Alu I restriction enzyme, isolate ORSK-4 showed the same cut profile as reference strains (Figure 6d). As a result of the cleavage of 16S rRNA gene regions of reference strains and isolate with Hae III restriction enzyme, that the isolate ORSK-4 showed the same cut profile as reference strains (Figure 6e). As a result of the cleavage of 16S rRNA gene regions of reference strains and the isolate (with Taq I restriction enzyme), ORSK-4 showed the same cut profile as reference strains (Figure 6f).

3.4. Optimum enzyme production conditions for strain ORSK-4

Different conditions were tested for the optimum protease activity of isolate ORSK-4 (Figure 7). Optimum protease enzyme activities of the isolate ORSK-4 on enzyme medium and N.B medium were measured, and the highest enzyme activity was found to be the enzyme medium at 27 °C and pH 7.0, and after 3 days of incubation.

It was seen that the partially purified protease enzyme obtained from ORSK-4 complies with the conditions characterized above. The effect of organic enzyme medium content changes on ORSK-4 protease enzyme activity is given in Figure 8A. As a result of the modification of organic compounds, the compound increasing the protease enzyme activity the most was the amount of peptone increased five times when compared to the control. The absence of the casein on the medium significantly reduced the protease enzyme activity. The effect of inorganic enzyme medium content changes on ORSK-4 protease enzyme activity is given in Figure 8B. As a result of the replacement of inorganic compounds, the compound increasing the protease enzyme activity the most was found to be the amount of K_2HPO_4 , which was increased by 25.81% when compared to the control. The absence of $CaCl_2$ in the medium reduces protease activity by 39.78% compared to the control.

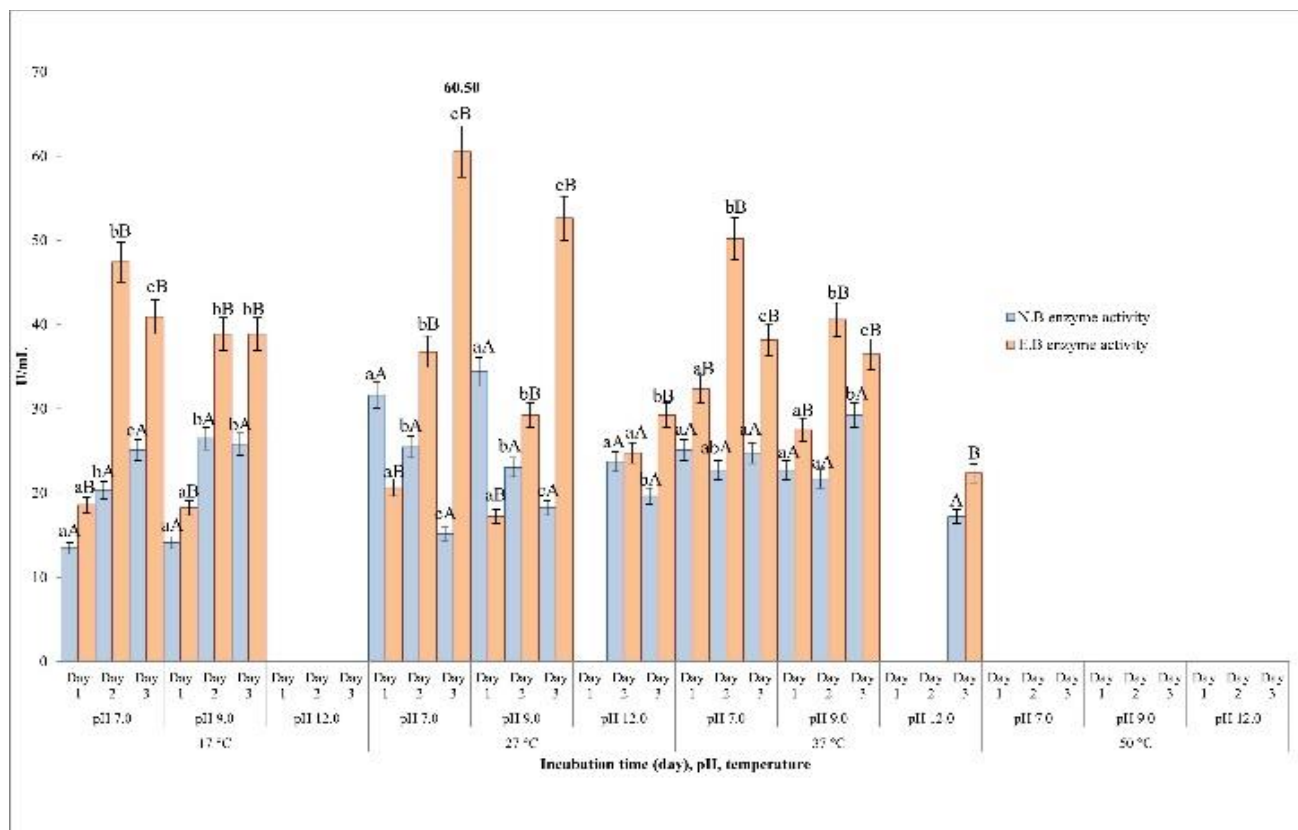


Fig. 7. Optimal protease activity of isolate ORSK-4 under different conditions. While different lower-case letters (a, b) on the graph show significant differences between different incubation times at the same temperatures, same pH ($p < 0.05$) and same medium, capital letters (A, B) indicate significant differences between different incubation times, same temperature and pH ($p < 0.05$) on different media.

Types of carbon and nitrogen sources affect the production of extracellular enzymes (Reddy and Kanwal 2022). The effect of the medium using only nitrogen source as an organic compound on ORSK-4 protease enzyme activity is given in Figure 9A. The use of 12 g/L casein in the medium prepared as the sole nitrogen source increased the protease enzyme activity by 71.91% when compared to the control. When only 5 g/L of urea was present in the medium, the protease enzyme activity decreased by 89.89% when compared to the control group. The effect of different inorganic nitrogen sources on ORSK-4 protease enzyme activity is given in Figure 9B. Although there were no significant changes compared to

the control when different inorganic nitrogen sources were added, a 12.50% increase in protease activity was observed with the addition of 0.1 g/L sodium nitrate. The effect of different carbon sources on ORSK-4 protease enzyme activity is given in Figure 10. The effects of carbon sources on enzyme activity were investigated by using equal amounts of maltose, fructose, sucrose and starch instead of carbon sources on the medium. Adding glucose and fructose to the medium significantly decreased ORSK-4 protease enzyme activity while adding starch, lactose, sucrose, and galactose to the medium increased the protease enzyme activity of isolate ORSK-4.

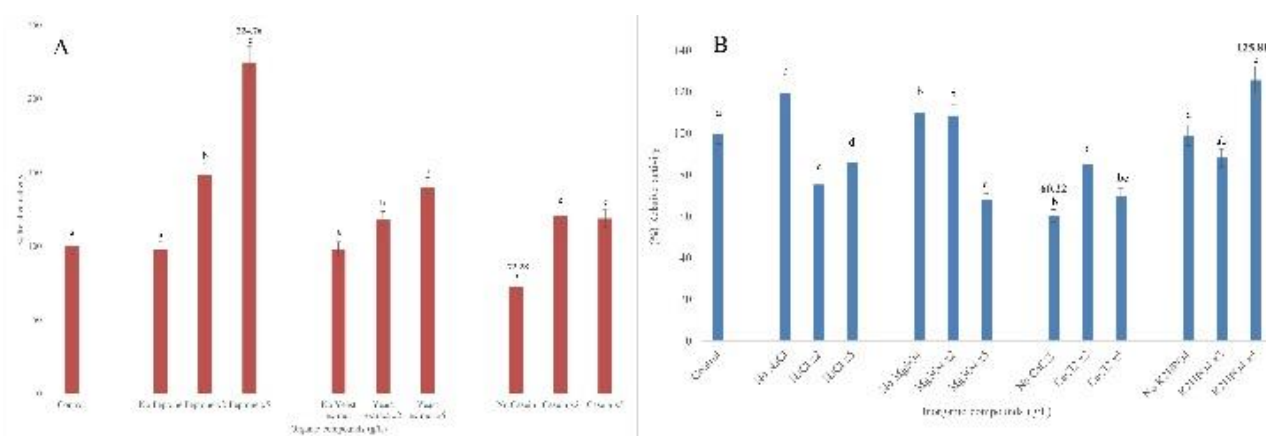


Fig. 8. A: Effect of content change in organic enzyme medium on the protease enzyme production of ORSK-4. Different letters (a, b, c) on the graph indicate significant differences between the control and the different organic compounds on the medium ($p < 0.05$), B: Effect of inorganic enzyme medium content changes on the protease enzyme activity of ORSK-4. Different letters (a, b, c) on the graph indicate significant differences between the control and the different inorganic compounds on the medium ($p < 0.05$).

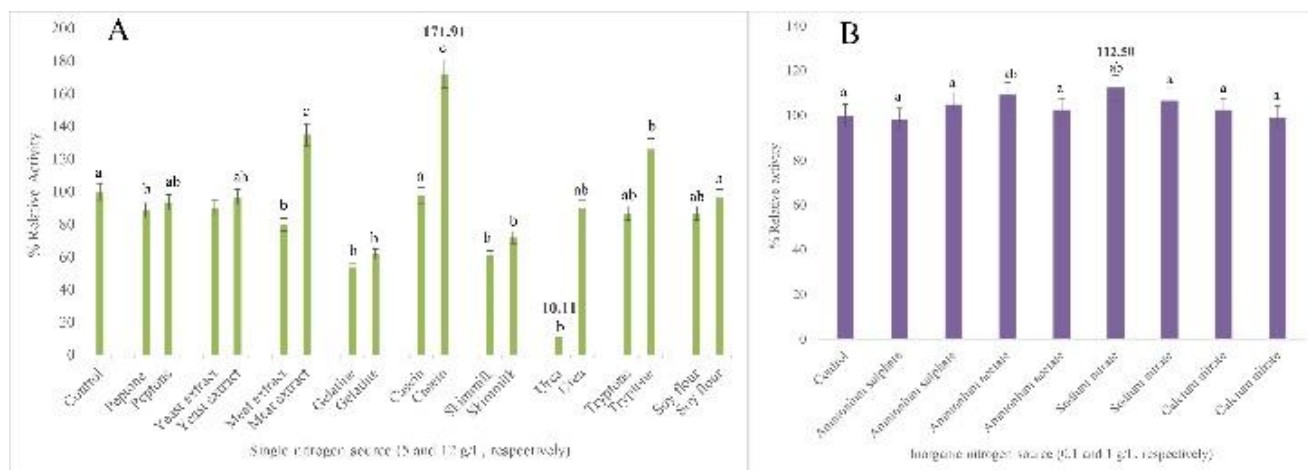


Fig. 9. A: The effect of the medium using only nitrogen source as organic compound on the protease enzyme activity of ORSK-4. Different letters (a, b, c) on the graph indicate significant differences between the control and the different nitrogen sources on the medium ($p < 0.05$), B: Effect of different inorganic nitrogen sources on the protease enzyme activity of ORSK-4. Different letters (a, b) on the graph indicate significant differences between the control and the different inorganic nitrogen sources on the medium ($p < 0.05$).

ORSK-4 protease enzyme activity on the optimized modified and meat-casein medium is given in Figure 10. The protease enzyme activity was measured approximately three folds higher in the optimized modified medium than in the normal enzyme medium (Figure 11A). The protease enzyme activity of ORSK-4 was measured approximately two folds higher in the meat-casein medium compared to the normal medium (Figure 11B).

3.5. Comparison of protease activity of some *Bacillus* genus microorganisms and isolated ORSK-4

A comparison of the protease activity of ORSK-4 isolated with *Bacillus cereus* ATCC 10876 (Figure 12A) and *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Figure 12B) strains is given in Figure 11. The enzyme activity of isolate ORSK-4 showed higher activity than the compared ATCC strains.

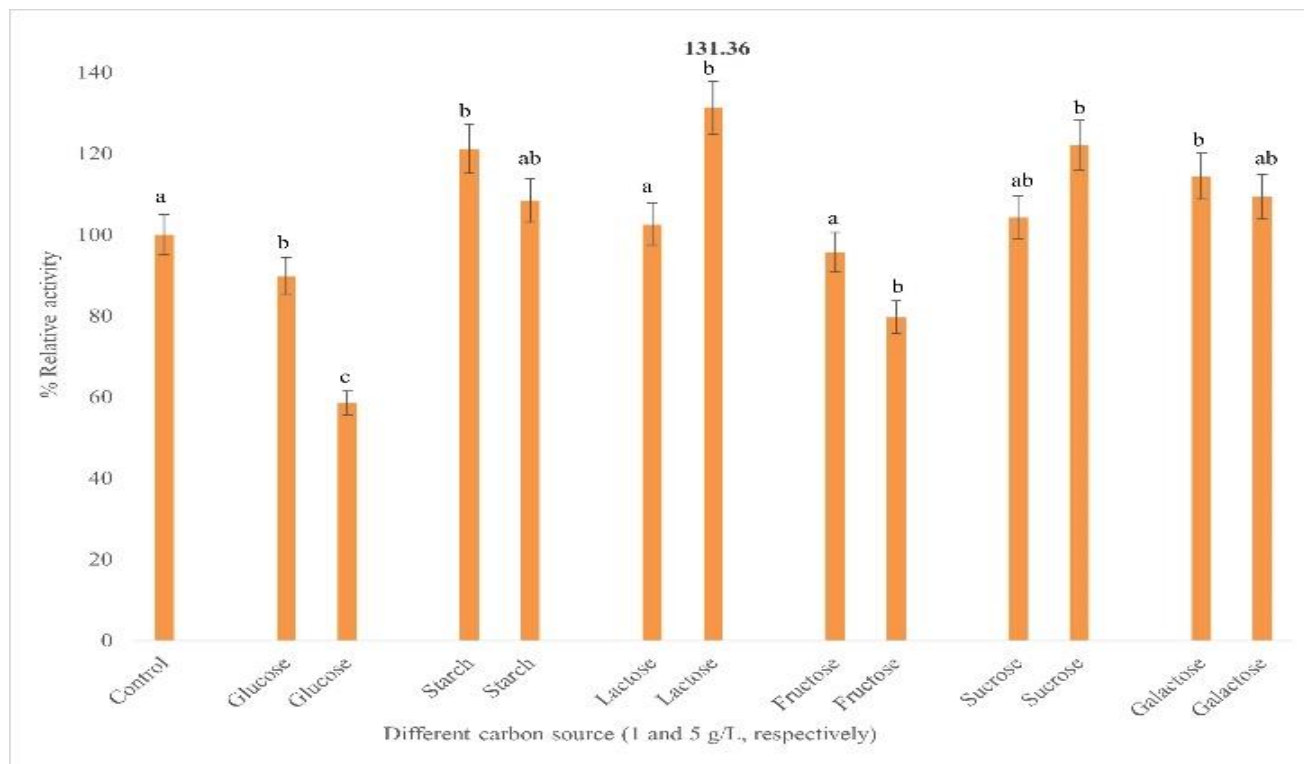


Fig. 10. Effect of different carbon sources on the protease enzyme activity of ORSK-4. Different letters (a, b, c) on the graph indicate significant differences between the control and the different carbon sources on the medium ($p < 0.05$).

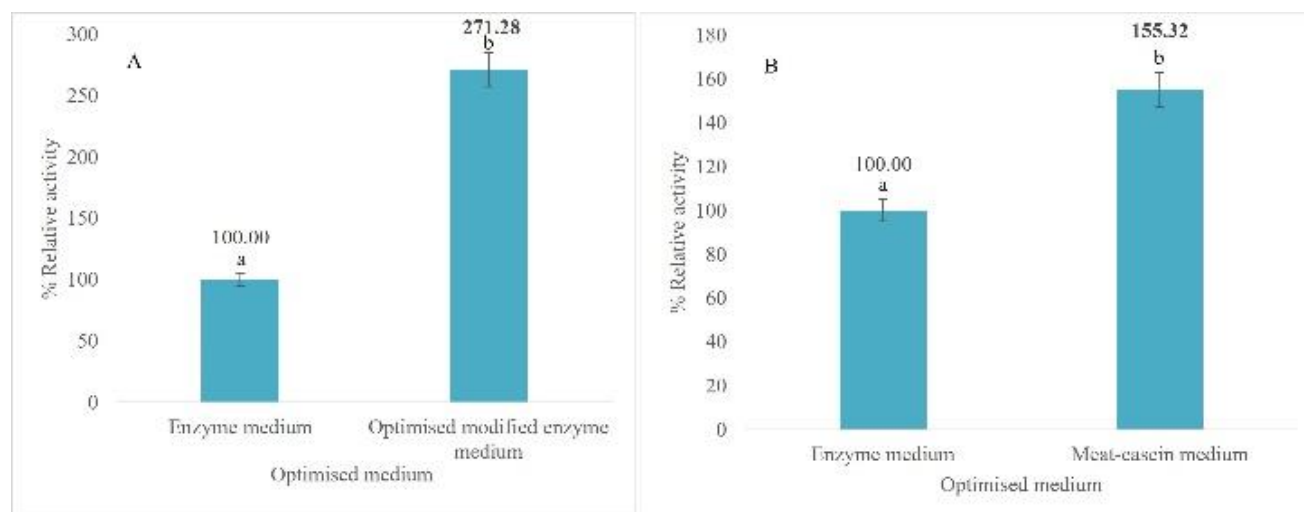


Fig. 11. ORSK-4 protease enzyme activity in optimized modified meat-casein medium. Different letters (a, b) on the graph indicate significant differences between enzyme medium and optimized modified media ($p < 0.05$).

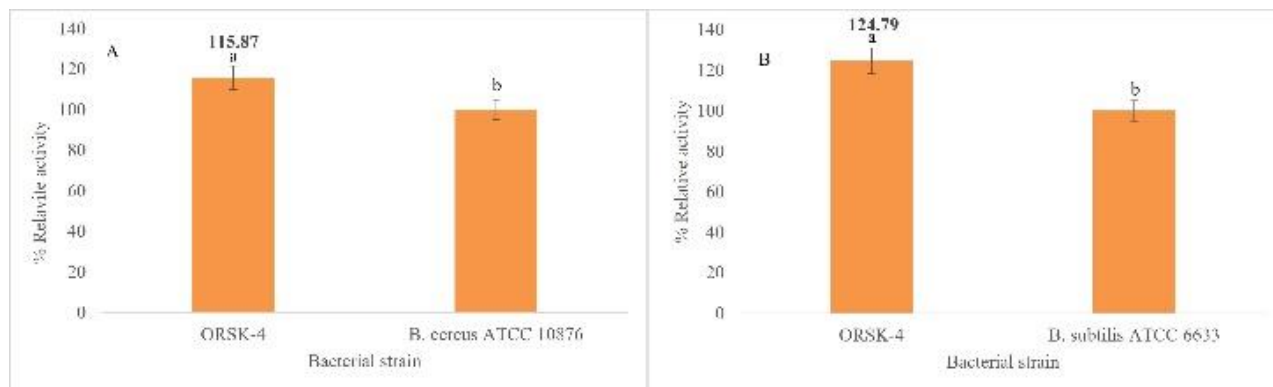


Fig. 12. A: Comparison of protease activity of strain ORSK-4 with *B. cereus* ATCC 10876. Different letters (a, b) in the graph indicate significant differences between ORSK-4 and *B. cereus* ATCC 10876 and *B. subtilis* ATCC 6633 protease activities ($p < 0.05$), B: Comparison of protease activity of strain ORSK-4 with *B. subtilis* ATCC 6633.

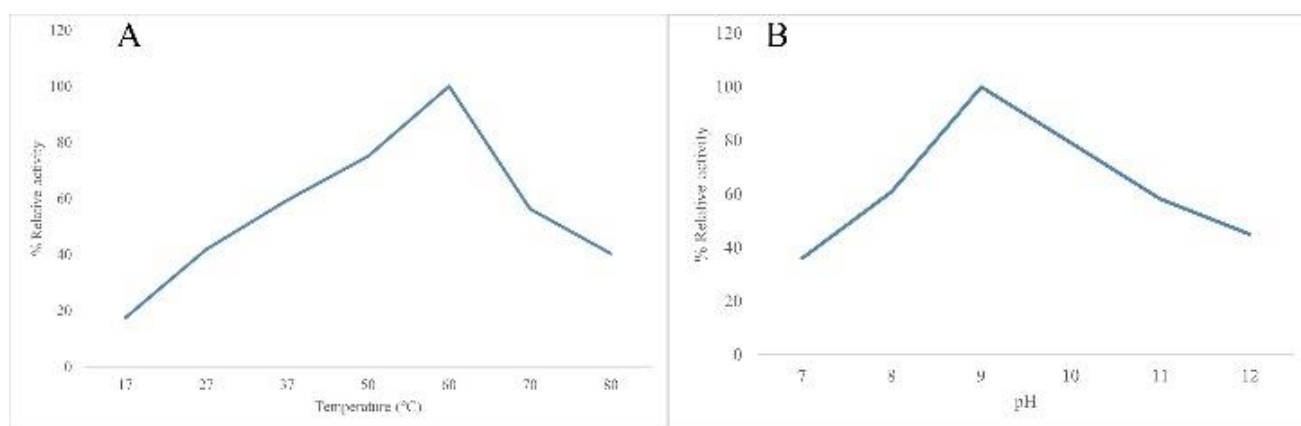


Fig. 13. A: Determination of the optimum working temperature of the protease enzyme, B: Determination of the optimum working pH of the protease enzyme.

3.6. Stability of protease enzyme obtained from isolated ORSK-4

The determination of the optimum operating temperature of the enzyme is given in Figure 13A. It was observed that the protease enzyme obtained from the isolated ORSK-4 increased until reaching 60 °C but decreased at 70 °C and 80 °C. While the ability to isolate ORSK-4 to produce protease was evaluated between 17 °C and 80 °C, and maximum enzyme production was observed at 60 °C, a decline in the production of enzyme was detected at temperatures above 60 °C, which is also an indicator for ORSK-4 isolate's heat-proof nature.

The determination of the optimum working pH of the enzyme is shown in Figure 13B. It was observed that the activity of protease enzyme obtained from isolated ORSK-4 increased up to pH 9.0 and then gradually decreased until reaching pH 12.0. This pH value demonstrates that the obtained enzyme is alkaliphilic.

It is known that pH and temperature are of great importance during the process of enzyme production by microorganisms. The optimum pH value for protease enzyme production was reported as 10.0 in a similar study. When the pH value was increased, a decrease in enzyme activity was observed (Verma and Pandey 2019). The effect of +1 and +3 valence metal ions on the enzyme activity is given in Figure 14A. 2 mM LiCl increased the protease activity by 33.79% compared to the control, while 10 mM AlCl₃ decreased the activity by 35.13%. It was observed that Mn(SO₄)₂, one of the bivalent metal ions, increased the enzyme activity by 64.37% compared to the control, while Fe(NO₃)₂ metal ions inhibited the activity by 81.61%. In one of their studies, Ullah et al. (2022) evaluated the enzyme activities based on the control group after the incubation with metal ions and found that Mg⁺² and Ca⁺² ions had a considerable stimulating effect on protease activities (Ullah et al. 2022). The effect of bivalence metal ions on the enzyme activity is given in Figure 14B.

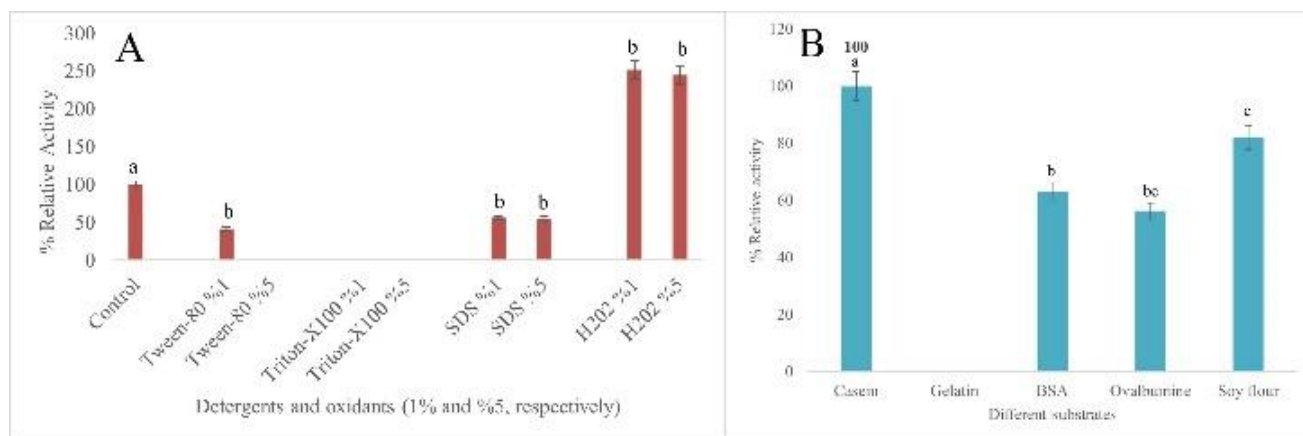


Fig. 16. A: Effects of surfactants, detergents and oxidants on enzyme activity. Different letters (a, b, c) on the graph indicate significant differences between the control and media containing surfactants, detergents and oxidants ($p < 0.05$), **B:** Effects of different substrates on enzyme activity. Different letters (a, b, c) on the graph indicate significant differences between control and media containing different substrates ($p < 0.05$).

Table 3. Summary of the purification step for the proteolytic enzyme from *B. cereus* ORSK-4

Purification steps	T.P. (mg)	T.A. (U)	S.A. (U/mg)	Recovery (%)	Purification
Crude extract	28.8	363.5	12.61	100	1
30% ASP	17.9	289.9	16.23	79.74	1.29
80% ASP	10.4	239.7	23.14	65.93	1.83
Dialysis	4.22	180.1	42.71	49.54	3.39
DEAE IEC	1.97	125.3	63.48	34.48	5.03

ASP (Ammonium sulphate precipitation), IEC (Ion exchange chromatography), T.P. (Total protein), T.A. (Total activity), S.A. (Specific activity)

The specific activity of the crude homogenate (12.61 U/mg) increased up to 16.23 U/mg and 23.14 U/mg respectively after 30% and 80% ammonium sulfate precipitation; up to 42.71 U/mg after dialysis; and up to 63.48 U/mg after ion exchange chromatography. It resulted in a yield of approximately 34.48% and a purification fold of 5.03. Verma et al. (2019) first applied 80% ammonium sulfate precipitation and then DEAE ion exchange chromatography for the partial purification of the protease enzyme, and it was found that the enzyme recovery was 77% while the purification layer was 1.66. Furthermore, enzyme purity increased by 1.75 times with 45% yield as a result of enzyme DEAE (Verma and Pandey 2019). After chromatography, SDS-PAGE was performed in the 2nd and 24th fractions. A band was observed in the 2nd fraction and the 24th fraction. The molecular weight of the protease in the second fraction was determined to be 20 kDa, and the protease in the 24th fraction was found to be 30 kDa. The SDS-PAGE execution image is given in Figure 17.

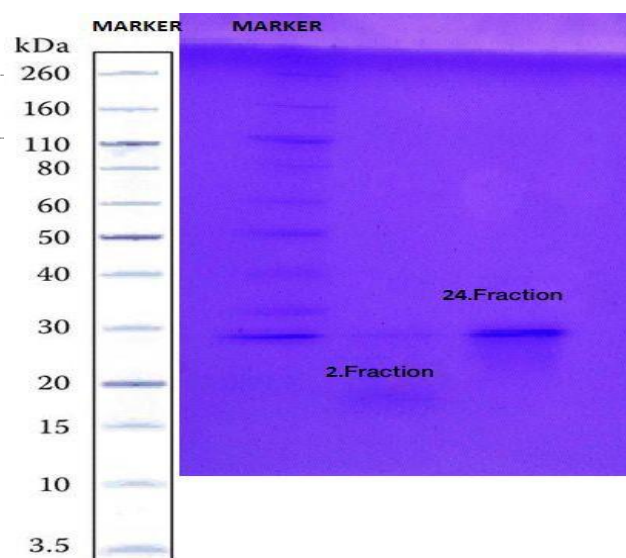


Fig. 17. SDS-PAGE execution

4. Discussion

Within the scope of this study, the protease-producing microorganisms in the soil sample taken from a high-protein region were purified, and the most suitable breeding and protease enzyme production conditions for these microorganisms were determined. Similar to the study carried out by Agasthya et al. (2013), the bacteria isolated from the soil and used in this study were grown on a skim-milk medium, and protease producers were selected based on their zone size and colony morphology differences (Agasthya et al. 2013). Some studies found that most of the bacteria isolated from the soil were *Bacillus* species (Liu et al. 2021; Lopez et al. 2023; Luang-In et al. 2019; Syed et al. 2007).

The maximum activity of the protease enzyme that is commercially significant was reported to be between pH 8-11 intervals. It is also known that many major proteases used in the detergent industry are between pH 7.0-11.0 interval (Hashmi et al. 2022). Therefore, the activity of the ORSK-4 protease enzyme was screened to determine whether it is suitable for both commerce and the detergent industry, and it was found that it maintained the activity within this pH interval. The fact that obtained protease showed its optimum activity at 37°C means *Bacillus cereus* is a mesophilic bacterial strain. On the other hand, a further increase in the temperature resulting in a decline in protease activity suggests that bacteria stopped producing enzyme because of molecular degradation. In a similar study carried out on the protease enzyme produced by *Bacillus* sp., it was found that the optimum temperature for the production of protease enzyme is 37°C (Abusham et al. 2009).

Because substances constituting the growth medium of the bacteria play a key role in biosynthesis and energy production, they are also of great importance for the production of alkaline proteases (Abu-Khudir et al. 2019). It was reported that culture conditions are likely to be a determinant of extracellular protease production by microorganisms. Thus, it became crucial to measure the activity of proteases under different conditions (Suberu et al. 2019). In the study conducted by Jadhav et al. (2020), it was found that the optimum incubation temperature for protease enzyme production of the genus *Bacillus* isolated from the soil was 30°C (Jadhav et al. 2020). Another study conducted by Varol et al. (2023) reported that the pH value in which the bacteria produce the enzyme at the maximum level was 7.0 and the optimum incubation period was 72 hours (Varol et al. 2023).

The pH of the culture medium plays a vital role in the transportation of the components enabling cell growth and product production through the membrane (Suberu et al. 2019). Proteases obtained from *Bacillus* sp. were characterized by their molecular weight of 27-71 kDa, optimum pH of 6-10, temperature of 37- 60 °C and stability values in a wide pH and temperature range (Karray et al. 2021). It was seen that the partially purified protease enzyme obtained from ORSK-4 complies with the conditions characterized above.

In the study conducted by Karray et al. (2021), nitrogen sources in the growth medium were changed to measure the changes in the enzyme activity obtained from *Bacillus stearothermophilus*, and the highest activity was observed in the yeast extract (Karray et al. 2021). Similarly, in another study carried out by Suberu et al. (2019), the effects of nitrogen source change on the activity of protease obtained from *Bacillus* were examined, and it was revealed that the best source of nitrogen for *cereus* ABBA1 and *B. subtilis* RD7 strains was beef extract that was followed by peptone and yeast extract (Suberu et al. 2019).

In a study done by Verma et al. (2019), the effect of different carbon sources such as galactose, lactose, maltose, sucrose and starch on the enzyme activity was investigated, instead of the original carbon source (Verma and Pandey

2019). As a result, a maximum level of enzyme production was found in lactose. Ahmetoğlu et al. (2015) reported that the use of lactose as a carbon source to produce protease gave the best results (Ahmetoglu et al. 2015). In another study carried out by Abu-Khudir et al. (2019), the effects of different nitrogen sources on the production of protease were tested on a medium containing yeast extract, ammonium sulphate, peptone, ammonium chloride, beef extract or urea, and the maximum level of enzyme production was obtained by adding yeast extract (229.03 U/ml) when compared to the control (189.04 U/ml) (Abu-Khudir et al. 2019).

Varol et al. (2023) examined the impacts of inhibitors on protease activity and observed that PMSF (a serine protease inhibitor) and EDTA (a metalloprotease inhibitor) administrations brought about a strong inhibition (Varol et al. 2023). Similarly, the relative activities of PMSF, CuSO₄, EDTA at different concentrations resulted in a strong inhibition on the enzyme activity of 66%, 50% and 27% respectively, in our work. The effect of organic solvents on enzyme activity is given in Figure 14B. Heptane, hexane and benzene increased the activity of the protease enzyme, while other solvents decreased the activity of the protease enzyme. When compared to the control group, it was seen that 25% benzene increased the activity by 51,27%, while 25% toluene decreased it by 54.67%.

In one of their studies Hashmi et al. (2022) tried SDS, Triton X-100 and Tween 80 detergents on the protease enzyme obtained from *B. subtilis* S1 and *B. amyloliquefaciens* KSM12 strains, and obtained the lowest inhibition as % relative activity in SDS for *B. subtilis* S1 enzyme (50%) (Hashmi et al. 2022). As to this study, the relative activity obtained because of 1% and 5% SDS application was reported as 14% and 13% respectively. The effect of different substrates on enzyme activity is given in Figure 15B. While the highest protease enzyme activity was observed in the buffer containing casein, no protease activity was observed in the gelatin buffer.

Ullah et al. (2022) applied SDS-PAGE analysis to determine the molecular weight of the protease enzyme obtained from *Bacillus cereus* in their study, and reported that they obtained an enzyme of 35 kDa (Ullah et al. 2022). Besides, in another study performed by Hashmi et al. (2022), the molecular weight of partially purified protease enzyme (produced by *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens*) was found to be 17 and 65 kDa respectively by SDS-PAGE (Hashmi et al. 2022).

Optimizing protease production conditions requires a thorough understanding of microbial physiology, enzyme kinetics and fermentation processes. High yields of active proteases for various industrial applications can be achieved by carefully selecting microbial strains, designing appropriate growth media, controlling pH and temperature, optimizing oxygen transfer and adjusting fermentation parameters. Continued research and innovation in bioprocess engineering can enhance our ability to optimize

protease production and meet the growing demand for enzyme-based technologies.

5. Conclusion

In this study, the isolation of microorganisms producing protease enzyme, selection of appropriate strain for enzyme production, molecular identification of the strain, optimum enzyme production conditions, factors affecting enzyme production and enzyme stability, and enzyme molecular weight were identified by SDS-PAGE. Microorganisms isolated from alkaline protein-rich soil in the Yahşihan district of Kırıkkale province were used. The strain (ORSK-4) was active and stable even in the presence of various metal ions, inhibitors, surfactants, inhibitory agents, and organic solvents. These features supported that it could be a potential alternative in industrial applications.

Acknowledgements

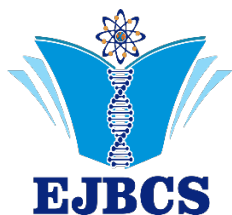
This study was supported by the Research Fund of Kırıkkale University (BAP 2016/067). The authors declare no conflict of interest. Authors also thank Kırıkkale University-KUBTUAM.

References

- Abu-Khudir R, Salem MM, Allam NG, Ali EMM. 2019. Production, Partial Purification, and Biochemical Characterization of a Thermotolerant Alkaline Metallo-Protease from *Staphylococcus Sciuri*. *Appl Biochem Biotechnol*. 189: 87–102. doi.org/10.1007/s12010-019-02983-6.
- Abusham RA, Rahman RNZRA, Salleh A, Basri M. 2009. Optimization of Physical Factors Affecting the Production of Thermo-Stable Organic Solvent-Tolerant Protease from a Newly Isolated Halo Tolerant *Bacillus subtilis* Strain Rand. *Microb Cell Fact*. 8: 1–9. doi.org/10.1186/1475-2859-8-20/FIGURES/7.
- Adrio J, Demain A. 2014. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. *Biomol*. 4: 117–139. doi.org/10.3390/biom4010117.
- Ahmetoglu N, Bekler FM, Acer Ö, Gül-Güven R. 2015. Production, Purification and Characterisation of Thermostable Metallo-Protease from Newly Isolated *Bacillus* Sp. KG5. *Eurasian J Biosci*. 9: 1–11.
- Asha B, Palaniswamy M. 2018. Optimization of Alkaline Protease Production by *Bacillus cereus* FT 1 isolated from Soil. *J Appl Pharm Sci*. 8: 119–127. doi.org/10.7324/JAPS.2018.8219.
- Bron S, Meima R, Maarten Van Dijk J, Wipat A, Harwood CR. 1990. Molecular Biology and Genetics of *Bacillus* Species. *Genetic analysis*. 27–74.
- Gessesse A, Gashe BA. 1997. Production of Alkaline Protease by an Alkaliphilic Bacteria Isolated from an Alkaline Soda Lake. *Biotechnol Lett*. 19: 479–481.
- Hashmi S, Iqbal S, Ahmed I, Janjua HA. 2022. Production, Optimization, and Partial Purification of Alkali-Thermotolerant Proteases from Newly Isolated *Bacillus subtilis* S1 and *Bacillus amyloliquefaciens* KSM12. *Processes*. 10: 1050. doi.org/10.3390/PR10061050.
- Jadhav HP, Sonawane MS, Khaimar MH, Sayyed RZ. 2020. Production of Alkaline Protease by Rhizospheric *Bacillus cereus* HP_RZ17 and *Paenibacillus xylanolyticus* HP_RZ19. *J. Environ. Sustain*. 3: 5–13. doi.org/10.1007/S42398-020-00096-Z.
- Karray A, Alonazi M, Horchani H, Ben Bacha AA. 2021. Novel Thermostable and Alkaline Protease Produced from *Bacillus stearothersophilus* Isolated from Olive Oil Mill Sols Suitable to Industrial Biotechnology. *Molecules*. 26: 1139. doi.org/10.3390/molecules26041139.
- Kazan D, Denizci AA, Öner MNK, Erarslan A. 2005. Purification and Characterization of a Serine Alkaline Protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 32: 335–344. doi.org/10.1007/s10295-005-0260-z.
- Kurabachew M, Enger Ø, Sandaa RA, Lemma E, Bjorvatn B. 2003. Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis in the Differentiation of Related Species of Mycobacteria. *J Microbiol Methods*. 55: 83–90. doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00119-2.
- Mason SD, Joyce JA. 2011. Proteolytic Networks in Cancer. *Trends Cell Biol*. 21: 228–237. doi.org/10.1016/j.tcb.2010.12.002.
- Panigrahi S, Velraj P, Subba Rao T. 2019. Functional Microbial Diversity in Contaminated Environment and Application in Bioremediation. *Microbial Diversity in the Genomic Era*. 359–385. doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00021-6.
- Rao MB, Aparna M, Tanksale, Mohini S, Ghatge, and Vasanti V. D, 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62(3): 597-635. doi: 10.1128/mmbr.62.3.597-635.1998.
- Reddy MS, Kanwal HK. 2022. Influence of Carbon, Nitrogen Sources, Inducers, and Substrates on Lignocellulolytic Enzyme Activities of *Morchella Spongiola*. *J Agric Food Res*. 7: 100271. doi.org/10.1016/J.JAFR.2022.100271.
- Sharma KM, Kumar R, Panwar S, Kumar A. 2017. Microbial Alkaline Proteases: Optimization of Production Parameters and Their Properties. *J. Genet. Eng. Biotechnol*. 15: 115–126. doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.02.001.
- Singh J, Batra N, Sobti RC. 2001. Serine Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochem*. 8–9: 781–785.
- Solanki P, Putatunda C, Kumar A, Bhatia R, Walia A. 2021. Microbial Proteases: Ubiquitous Enzymes with Innumerable Uses. *Biotech*. 3-11: 428. doi.org/10.1007/s13205-021-02928-z.
- Suberu Y, Akande I, Samuel T, Lawal A, Olaniran A. 2019. Optimization of Protease Production in Indigenous *Bacillus* Species Isolated from Soil Samples in Lagos, Nigeria Using Response Surface Methodology. *Biocatal Agric Biotechnol*. 18: 101011. doi.org/10.1016/J.BCAB.2019.01.049.
- Takami H, Akiba T, Horikoshi K. 1989. Production of Extremely Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus* Sp. No. AH-101. *Appl Microbiol Biotechnol*. 30: 120–124. doi.org/10.1007/BF00263997/METRICS.
- Ullah N, Rehman MU, Sarwar A, Nadeem M, Nelofer R, Shakir HA, Irfan M, Idrees M, Naz S, Nabi G, Shah S, Aziz T, Alharbi M, Alshammari A, Alqahtani F. 2022. Purification, Characterization, and Application of Alkaline Protease Enzyme from a Locally Isolated *Bacillus cereus* Strain. *Fermentation*. 8: 628. doi.org/10.3390/FERMENTATION8110628.
- Varol A, Albayrak S, Ozkan H, Demir Y, Taskin M, Adiguzel A. 2023. Production, Purification and Characterization of Novel Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus atrophaeus* V4. *Biologia (Bratisl)*. 78: 591–600. doi.org/10.1007/S11756-022-01281-7/FIGURES/5.
- Verma J, Pandey S. 2019. Characterization of Partially Purified Alkaline Protease Secreted by Halophilic Bacterium *Citricoccus* Sp. Isolated from Agricultural Soil of Northern India. *Biocatal Agric Biotechnol*. 17: 605–612. doi.org/10.1016/J.BCAB.2019.01.020.
- Yu C, Hongwei G, Yanming Z, Mingjun D, Zhenxing W, Laihua Z, Qing D, Biao X, Chengzhu L, Zhiqin Y, Xizhi X. 2012. Analysis of the Bacterial Diversity Existing on Animal Hide

and Wool: Development of a Preliminary PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Fingerprint Database for Identifying Isolates. J AOAC Int. 95: 1750–1754. doi.org/10.5740/jaoacint.11-482.

Zhang J, Zhu B, Li X, Xu X, Li D, Zeng F, Zhou C, Liu Y, Li Y, Lu F. 2022. Multiple Modular Engineering of *Bacillus amyloliquefaciens* Cell Factories for Enhanced Production of Alkaline Proteases from *B. clausii*. Front Bioeng Biotechnol. 10. doi.org/10.3389/fbioe.2022.866066.



Optimization of kanamycin dose for *in vitro* *Camelina sativa* transformation

Zemran Mustafa¹

^{*1} Sivas University of Science and Technology, Faculty of Agricultural Sciences and Technology, Department of Plant Production and Technologies, Sivas, Türkiye.

*Corresponding author : zemustafa@hotmail.com
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-1754-6320>

Received : 23/12/2023
Accepted : 16/04/2024

To Cite / Atıf için: Mustafa Z. 2024. Optimization of kanamycin dose for *in vitro* *Camelina sativa* transformation. Eurasian J Bio Chem Sci, 7(1):41-45
<https://doi.org/10.46239/ejbs.1408973>

Abstract: *Camelina sativa* is an underutilized oilseed crop that can be grown under different climate conditions. As its requirements for growth are relatively low with a short life cycle, it can be utilized in marginal lands for crop rotations. *Camelina* shows great promise as a source of food, feed, chemicals, and biofuel. Enabling the genetic transformation of *C. sativa* would facilitate the fast incorporation of new characteristics into this growing crop. Moreover, genetic and metabolic engineering can be applied to decrease unwanted secondary metabolites as well as boost the beneficial products. Kanamycin is one of the most used antibiotics in plant transformation. Here, the effects of kanamycin on the seeds of *Camelina* were analyzed by observing different parameters such as germination, seedlings, shoot, and root growth as well as its fresh and dry weight. Prevalent effects of kanamycin were shortening of root and shoot length, thinning of shoots, and discoloration. Also, true leaves could not grow in the presence of the antibiotic. Based on these results using 100mg/L kanamycin as an additive to the growth media in tissue culture would allow the selection of transformant plants and allow them to grow as transgenic plants for desired purposes.

Keywords: *Camelina*, genetic transformation, kanamycin, nptII gene

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

Camelina sativa (*Camelina*) is an oilseed plant classified under the Brassicaceae family that has attracted significant appreciation in recent years (Murphy 2016).

It is an annual plant with a very short life cycle of 85-100 days with the height at maturity ranging from 60 to 110 cm. It is predominantly a self-pollinating plant. The plant produces little yellow flowers arranged in a raceme formation, each consisting of four petals. Stems can be either smooth or hairy and it possesses branches that become woody as they mature. It has pear-shaped fruits around 5 mm in diameter. *C. sativa* seeds are small, weighing only 0.8 to 1.8 grams per 1000 seeds (Mondor and Hernández-Álvarez 2022). *Camelina* is an optimal crop for less fertile lands and regions with little rainfall, as it demands very little inputs. It is a resilient plant that has strong adaptability to many soil types and thrives in cold semi-arid regions and also exhibits a high tolerance for arid conditions (Rostami Ahmadvandi and Faghihi 2021; Urbaniak et al. 2008). It has nutritious seeds that have a high oil content ranging from 30% to 49% and a protein content

ranging from 24% to 31% which is similar to soybean (Mondor and Hernández-Álvarez 2022; Zubr 1997). Its oil has a significant amount of healthy polyunsaturated fatty acids (PUFAs), specifically linoleate (18:2) and linolenate (18:3) (Bansal and Durrett 2016). The efforts in the breeding programs of *Camelina* are focused on the increment of production, improving the oil content and its quality, and decreasing the glucosinolate (anti-nutritive) composition of the seeds (Ghidoli et al. 2023).

The depletion of inexpensive fossil fuel reserves and growing worries regarding climate change have heightened the necessity to acquire fuel and chemical products from renewable sources. Historically, *Camelina* has been utilized for both human and animal consumption and various non-food purposes, including the manufacturing of soap, cosmetics, lamp oil, and non-toxic paints (Zubr 1997). It is a superior crop for bio-diesel production due to its rapid growth and great yield potential of 1500-3000 kg ha⁻¹ year⁻¹ (Sainger et al. 2017). *C. sativa* is an ancient crop plant origin of which is assumed to be in the region between Russia and Ukraine whereas its cultivation dates back to

4000 BCE (Berti et al. 2016; Ghamkhar et al. 2010). It is a hexaploid plant with $2n=40$ chromosomes and a genome of 750 Mbp (Hutcheon et al. 2010).

Agrobacterium tumefaciens may efficiently introduce a DNA segment of interest into *C. sativa* via floral dip approach or in vitro leaf explant cultures, resulting in the production of transgenic seeds within a very short timeframe of 4-6 weeks. Transgenic seeds can be distinguished using selectable markers such as the red fluorescent protein (DsRed), mCherry fluorescent protein, or antibiotic resistance (Sitther et al. 2018; Lu and Kang 2008). In this study, different doses of kanamycin were applied in *in vitro* conditions to *C. sativa* seeds to elucidate its effect on germination and growth. Kanamycin is one of the most common antibiotic markers in plasmids used for genetic transformation. Thus, adjusting its dose of use is a prerequisite for generating transgenic *Camelina* plants through *in vitro* method.

2. Materials and Method

To study the effect of kanamycin in germination and growth, the Turkish cultivar Arslanbey of *C. sativa* was used.

2.1. Sterilization and culture

Surface sterilization was accomplished by treating the seeds with 70% commercial bleach (<5% w/v NaOCl) for 10 minutes then washing the seeds three times for 10 minutes with distilled sterile water. Ten seeds were placed on MS (Murashige and Skoog 1962) medium with different concentrations of kanamycin.

2.2. Preparation of media

To prepare MS medium, 0.44 % MS mineral salts, and vitamins were supplemented with 3% sucrose and 0.65% agar (Aasim et al. 2011). The pH of the solution was adjusted to 5.6 with 1M NaOH and 1M HCl. Following autoclave for 21 minutes at 121°C, the media was left to cool down for the addition of the antibiotic and then poured to plastic petri dishes for polymerization.

2.3. Antibiotic doses

Four doses of kanamycin MS25 (25 mg/L), MS50 (50 mg/L), MS75 (75 mg/L), and MS100 (100 mg/L) using filter sterilized (MF-Millipore™ Membrane Filter, 0.22 µm) kanamycin stock solution (50 mg/mL), as well as one MS medium without kanamycin (as negative control) was prepared.

2.4. Experimental design and analysis

All experiments were conducted in triplicate. Cultures were placed in the growth room under 16h day – 8h night photoperiod at 24°C. Seeds, their germination, and growth were monitored for 30 days, and the readings were recorded at the end of the experiment. Germination and seedling rates were also recorded. Shoot length, root length, and total length were measured using a ruler (Fig. 1). Fresh and dry

weight of each seedling was measured. For dry weight measurement, seedlings were placed into an oven at 65°C for 48 hours. One-way ANOVA analysis was performed using the Tukey test using Minitab 20.4 software.

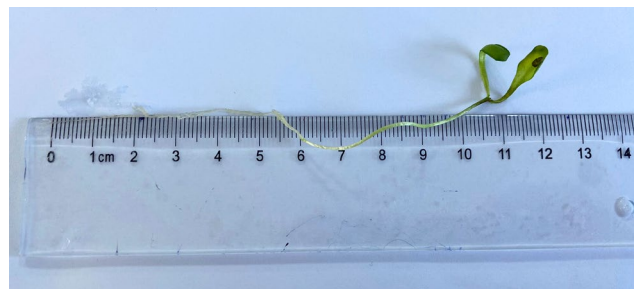


Fig. 1 Measurement of seedlings with a ruler

3. Results

The negative control, which is the MS medium without kanamycin, was used to examine seedlings one month after sowing in vitro (Fig. 2). There was considerable growth where roots and shoots were intertwined. Plants were healthy, with rooting system ready for acclimatization to the soil.



Fig. 2 Growth of *C. sativa* seeds on MS medium

The effects of kanamycin on seedlings were obvious even at low doses (25 mg/L). Roots were much shorter, likewise, shoot growth was retarded. The decrease in the length of shoots and roots was more emphasized at higher doses. No leaves other than cotyledonary leaves were present in the presence of kanamycin. True leaves were unable to grow within a one-month period. Discoloration was noticeably high at higher doses. The thickness of the shoots was also observed to be significantly reduced. Despite these effects, there was little reduction in germination and seedling even at higher doses (Fig. 3).

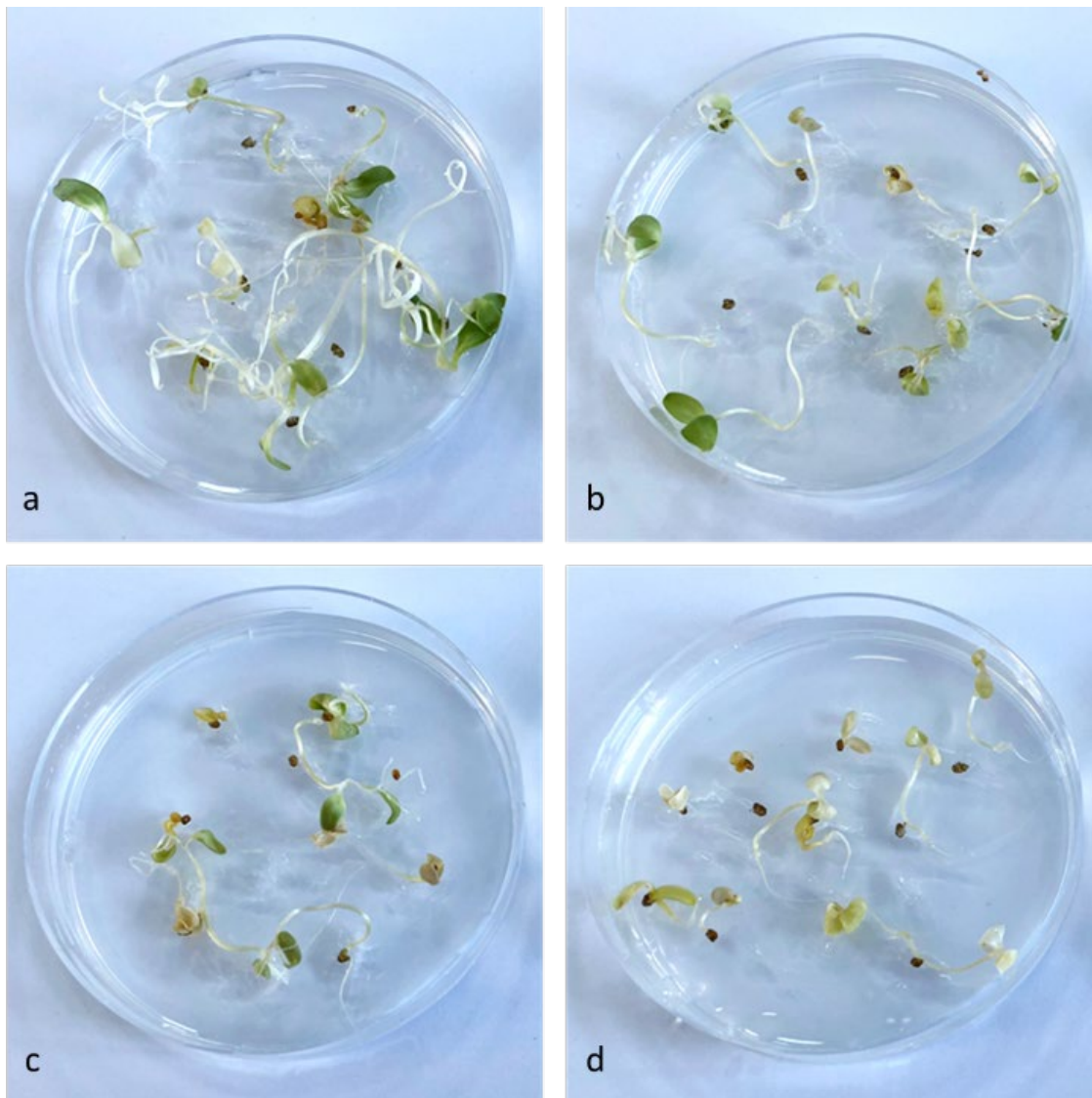


Fig. 3 Effect of different doses of kanamycin on *C. sativa* seeds; a) 25 mg/L, b) 50 mg/L, c) 75 mg/L, d) 100 mg/L

Table 1 *C. sativa* growth parameters on different kanamycin concentrations (30 days after sowing)

	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Total length (cm)
MS	4.8 ± 1.605 a	9.1 ± 1.636 a	13.9 ± 2.77 a
MS25	2.2 ± 0.975 b	5.5 ± 2.37 b	7.7 ± 1.987 b
MS50	2.3 ± 0.57 b	3.2 ± 0.837 bc	5.5 ± 1.173 bc
MS75	1.9 ± 1.025 b	2.5 ± 1.173 c	4.4 ± 2.043 bc
MS100	1.5 ± 0.935 b	2.5 ± 0.354 c	4 ± 1.173 c

* Letters following means in the same column indicate that the means are statistically significantly different ($p < 0.05$)

Table 2 *C. sativa* germination seedling and plant weight on different kanamycin concentration (30 days after sowing)

	Germination (%)	Seedling (%)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)
MS	100	100	0.3134 ± 0.115 a	0.01946 ± 0.015 a
MS25	100	90	0.0584 ± 0.025 b	0.00126 ± 0.0002 b
MS50	100	100	0.0324 ± 0.019 b	0.00264 ± 0.0003 b
MS75	90	70	0.0354 ± 0.017 b	0.00468 ± 0.0019 b
MS100	100	90	0.0238 ± 0.0093 b	0.00235 ± 0.0008 b

* Letters following means in the same column indicate that the means are statistically significantly different ($p < 0.05$)

The longest roots were obtained, as expected, in seedlings grown on MS medium with a mean value of 4.8 cm. The shortest root length was noticed at MS100 with a mean value of 1.5 cm. Root length on different kanamycin concentrations was statistically significant regarding the presence or absence of kanamycin. Shoot length ranged from 9.1 cm on MS medium to 2.5 cm on MS100 and there was a significant difference of shoot length between doses. The mean total length of the seedlings was 13.9 cm on MS medium, 7.7 cm on MS25, 5.5 cm on MS50, 4.4 cm on MS75, and 4 cm on MS100 and the difference was statistically significant (Table 1).

The antibiotic did not affect germination, and nearly all seeds had germinated at all conditions. The seedling stage

(growth of shoot) was slightly impaired in higher kanamycin doses decreasing to 70% and 90% at 75 mg/L and 100 mg/L respectively. Fresh weight was 0.31 g per seedling on MS medium decreasing gradually with increment of concentration of kanamycin down to 0.024 g, showing more than ten-fold decrease at 100 mg/L. Differences in fresh weight between doses of kanamycin were statistically significant. Similarly, dry weight decreased drastically from 0.019 g on MS medium to 0.0024 on 100 mg/L. Likewise, differences in dry weight between doses of kanamycin were statistically significant (Table 2).

4. Discussion

There is an ongoing demand for employing model plants that are suitable for genetic and metabolic engineering, that possess simple and high-capacity transformation systems, a fully sequenced genome, short life span, high yield, and the capability to analyze the produced plants in field experiments (Malik et al. 2018).

Generally, *Arabidopsis thaliana* is used in transgenic studies, but *Camelina sativa* is emerging as a new promising plant as a model for oilseed crops for seed oil production where metabolic engineering can be achieved easily (Bansal and Durrett 2016). Its compliant nature for genetic transformation has created attention for researchers to apply genome editing systems such as CRISPR/Cas9.

Besides the floral dip method, which has an efficiency of around 1%, tissue culture protocol can be used for the transformation of *C. sativa* (Liu et al. 2012). Even though tissue culture is more difficult to accomplish, it is advantageous in its efficiency, getting more seedlings in small areas with almost all surviving plants being transgenic positive. One of the most important aspects of tissue culture is adjusting the dose of selective antibiotic, such that it will not let the untransformed plants grow, but also would not hamper the growth of the transformed plants (Bakhsh et al. 2015; Anayol et al. 2016; Ahmed et al. 2017). Kanamycin is one of the most robust and commonly used antibiotics in gene transformation efforts. Non-transformant plants are normally susceptible to kanamycin, whereas the transformed plants that have the nptII gene (neomycin phosphotransferase II enzyme) incorporated in their genome will survive and grow under certain kanamycin

concentrations. There are 133 genetic transformation events globally that incorporated the nptII gene along with the desired traits for commercial use (ISAAA GM Approval Database 2023).

In *Camelina*, kanamycin causes the shortening of shoots and roots. Moreover, true leaves did not emerge even at lower kanamycin concentrations. Discoloration of leaves and stems accompanied by the death of tissues at high kanamycin concentrations was noticed (Fig. 3). At 100 mg/L dose no green leaves remained after a one-month period. In their publication, Sittther et al. (2018) used shoot apical meristems of *C. sativa* for transformation with EGFP and nptII genes. They used 40 mg/L kanamycin to select the transformant plants, however, some green parts remained in untransformed plants. Ontiveros-Cisneros et al. (2022) used up to 150 mg/L kanamycin on wild-type *Camelina* seeds and still, green leaves were visible and could not distinguish between wild-type and transformant seeds. Probably the seeds of the wild type of *C. sativa* used in their study have higher antibiotic resistance as it is the only publication where kanamycin could not be used successfully for transformant selection.

Kanamycin did not impede the germination of *Camelina* seeds, while it had minimal effect on their transition to the seedling stage. Similar effects were recorded by Ontiveros-Cisneros et al. (2022) where all the seeds germinated even at higher doses (150 mg/L) of kanamycin. The effect on root length, fresh weight, and dry weight was statistically significant, however, all the kanamycin doses (except MS0) were grouped in the same group according to Tukey's test. In shoot length and total length addition of kanamycin at different concentrations resulted in statistically different results. In their study Sittther et al. (2019) also found a diminishing of shoot and root length however, plant tissues were undergone necrosis even at 40 mg/L of kanamycin. Their cultivars (PI650159 and PI650161) seem to be more susceptible to the antibiotic. Using shoot apical meristems as explants may require lower doses of kanamycin. On the other hand, Zakharchenko et al. (2013) used 50 mg/L of kanamycin for the selection of transgenic seeds but there is no information on the condition of non-transformant plants.

5. Conclusion

Based on these findings, 100 mg/L concentration is considered to be suitable for selecting transformed Arsalanbey cultivar seeds and tissues from non-transformed ones, as there were no green patches on leaves and ultimately no photosynthesis. It is important to optimize the concentration of the antibiotics for each cultivar before starting the selection procedure. This study presents a framework for the genetic transformation of *C. sativa* via tissue culture. Diversifying methods of transformation will open the opportunity to use them for study-specific purposes.

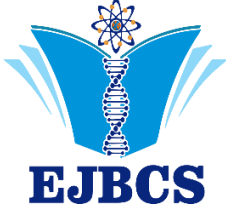
Acknowledgments

The Author thanks Field Crops Central Research Institute (Ankara, Türkiye) for providing the Turkish cultivar

Arslanbey of *Camelina sativa*. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors

References

- Aasim M, Sahin-Demirbag N, Khawar KM, Kendir H, Özcan S. 2011. Direct Axillary hoot Regeneration From The Mature Seed Explant Of The Hairy Vetch (*Vicia villosa* Roth). *Arch Biol Sci.* 63(3):757-762
- Ahmed HAA, Onarici S, Bakhsh A, Akdoğan G, Karakoç OC, Özcan SF, Aydın G, Aasim M, Ünlü L, Sancak C, Naimov S, Özcan S. 2017. Targeted expression of insecticidal hybrid SN19 gene in potato leads to enhanced resistance against Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) and tomato leafminer (*Tuta absoluta* Meyrick). *Plant Biotechnol Rep.* 11:315–329
- Anayol E, Bakhsh A, Karakoç OC, Onarici S, Kom D, Aasim M, Ozcan FS, Barpete S, Khakbazi SD, Önel B, Sancak C, Khawar KM, Ünlü L, Özcan S. 2016. Towards better insect management strategy: restriction of insecticidal gene expression to biting sites in transgenic cotton. *Plant Biotechnol Rep.* 10(2): 83-94
- Bakhsh A, Anayol E, Özcan SF, Hussain T, Aasim M, Khawar KM, Özcan S. 2015. An insight into cotton genetic engineering (*Gossypium hirsutum* L.): current endeavors and prospects. *Acta Physiol Plant* 37:1-17
- Bansal S, Durrett TP. 2016. *Camelina sativa*: An ideal platform for the metabolic engineering and field production of industrial lipids. *Biochimie.* 120:9-16
- Berti M, Gesch R, Eynck C, Anderson J, and Cermak S. 2016. *Camelina* uses, genetics, genomics, production, and management. *Ind Crops Prod.* 94: 690-710
- Ghamkhar K, Croser J, Aryamanesh N, Campbell M, Kon'kova N, Francis C. 2010. *Camelina* (*Camelina sativa* (L.) Crantz) as an alternative oilseed: molecular and ecogeographic analyses. *Genome.* 53(7):558-567
- Ghidoli M, Ponzoni, E, Araniti F, Miglio D, Pilu R. 2023. Genetic Improvement of *Camelina sativa* (L.) Crantz: Opportunities and Challenges. *Plants.* 12(3):570
- Hutcheon C, Ditt RF, Beilstein M, Comai L, Schroeder J, Goldstein E, ... Kiser J. 2010. Polyploid genome of *Camelina sativa* revealed by isolation of fatty acid synthesis genes. *BMC plant biol.* 10(1):1-15
- ISAAA's GM Approval Database. 2023. <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase>. Accessed 15 Dec 2023
- Liu X, Brost J, Hutcheon, C, Guilfoil R, Wilson AK, Leung S, ... De Rocher J. 2012. Transformation of the oilseed crop *Camelina sativa* by *Agrobacterium*-mediated floral dip and simple large-scale screening of transformants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 48:462-468
- Lu C, Kang J. 2008. Generation of transgenic plants of a potential oilseed crop *Camelina sativa* by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep.* 27:273-278
- Malik MR, Tang J, Sharma N, Burkitt C, Ji Y, Mykytyshyn M, ... Snell KD. 2018. *Camelina sativa*, an oilseed at the nexus between model system and commercial crop. *Plant Cell Rep.* 37(10):1367-1381
- Mondor M, Hernández-Álvarez AJ. 2022. *Camelina sativa* composition, attributes, and applications: A review. *Eur J Lipid Sci Technol.* 124(3):2100035
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15(3):473-497
- Murphy EJ. 2016. *Camelina* (*Camelina sativa*). In: *Industrial oil crops* (pp. 207-230). AOCS press
- Ontiveros-Cisneros A, Moss O, Van Moerkercke A, Van Aken O. 2022. Evaluation of antibiotic-based selection methods for *Camelina sativa* stable transformants. *Cells.* 11(7):1068
- Rostami Ahmadvandi H, Faghihi A. 2021. Adapted oilseed crops with the ability to grow economically in dryland conditions in Iran. *Agrotechniques ind. crops.* 1(3):122-128
- Sainger M, Jaiwal A, Sainger PA, Chaudhary D, Jaiwal R, Jaiwal PK. 2017. Advances in genetic improvement of *Camelina sativa* for biofuel and industrial bio-products. *Renew Sust Energ Rev.* 68:623-637
- Sitther V, Tabatabai B, Enitan O, Dhekney S. 2018. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Camelina sativa* for production of transgenic plants. *J. biol. methods.* 5(1)
- Sitther V, Tabatabai B, Enitan O, Fathabad SG, Dhekney S. 2019. Production of transgenic *Camelina sativa* plants via *Agrobacterium*-mediated transformation of shoot apical meristems. *Am. J. Plant Sci.* 10(01):1
- Urbaniak SD, Caldwell CD, Zheljzkov VD, Lada R, Luan L. 2008. The effect of cultivar and applied nitrogen on the performance of *Camelina sativa* L. in the Maritime Provinces of Canada. *Can J Plant Sci.* 88(1):111-119
- Zakharchenko NS, Kalyaeva MA, Buryanov YI. 2013. Expression of cecropin P1 gene increases resistance of *Camelina sativa* (L.) plants to microbial phytopathogenes. *Russ J Genet.* 49:523-52
- Zubr J. 1997. Oil-seed crop: *Camelina sativa*. *Ind Crops Prod.* 6(2), 113-119



Kozmopolit bir bitki türü olan *Ephedra distachya* L.'ye ait halüsinojenik etken maddelerin GC-MS yöntemiyle belirlenmesi

Handan Uysal*^{ID}, Mehmet İnce^{ID}

Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kriminalistik Ana Bilim Dalı, Erzurum, Türkiye

*Corresponding author : hausyal@atauni.edu.tr
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4290-8223>

Received : 08/06/2024
Accepted : 09/06/2024

To Cite / Atıf için: Uysal H, İnce M. 2024. Kozmopolit bir bitki türü olan *Ephedra distachya* L.'ye ait halüsinojenik etken maddelerin GC-MS yöntemiyle belirlenmesi. Eurasian J Bio Chem Sci, 7(1):46-51 <https://doi.org/10.46239/ejbc.1480648>

Özet: Halüsinojenler (hayal gördürücüler) kullanıldığında kişiyi gerçek dünyadan uzaklaştırıp ütöpic düşünelere yönlendiren maddeler olarak tanımlanmaktadır. Bu maddeleri kullanan kişilerde zaman ve mekan önemsizleşir, düşünce, algı ve duyuşal bozukluklar gözlenir. Halüsinojenlerin başlıca örnekleri esrar, fensiklidin, liserjik asit dietilamid (LSD) ve psilosibindir. Tüm bu bağımlılık yapıcı maddeler başta merkezi sinir sistemi olmak üzere karaciğer ve böbrek gibi hayati organları etkilemekte ayrıca verem, kanser, kangren gibi birçok ölümcül hastalığa da neden olmaktadır. Bu çalışma, halk arasında kişiye kendisini iyi hissettirdiği için gün içinde sürekli kullanılan, kozmopolit olduğu için de kolay ve her yerde yetişen ve kullanımı yasak olmayan Efedraceae familyasına dikkat çekebilmek için yapılmıştır. *Ephedra distachya* L.'nin halk arasında özellikle gövde, tohum ve çiçek gibi toprak üstü kısımları kullanılmaktadır. Bu nedenle kurutulmuş toz haline getirilen bu kısımlara ait metanol ve su ekstraktları hazırlanarak GC-MS yöntemiyle tüm kimyasal bileşenleri bakımından değerlendirilmiştir. Elde edilen GC-MS verilerine göre, yalnızca gövde kısmının her iki ekstresinde halüsinojenik etken bileşenler bulunmuştur. Ayrıca bitkisel ekstraktlara ait potansiyel etken maddelerin belirlenebilmesi hem halk sağlığı hem de kriminal bakımdan da oldukça önemlidir.

Anahtar kelimeler: Halüsinojenik maddeler, bağımlılık, bitkisel bileşenler, *Ephedra distachya*

Determination of hallucinogenic active substances of Ephedra distachya L., a cosmopolitan plant species, by GC-MS Method

Abstract: Hallucinogens are defined as substances that, when used, distract the person from the real world and direct them to utopian thoughts. In people who use these substances, time and space become unimportant, and thought, perception and sensory disorders are observed. Prime examples of hallucinogens are marijuana, phencyclidine, lysergic acid diethylamide (LSD), and psilocybin. All these addictive substances affect vital organs such as the central nervous system, liver and kidneys, and also cause many fatal diseases such as tuberculosis, cancer and gangrene. This study was carried out to draw attention to the Ephedraceae family, which is used constantly throughout the day because it makes people feel good, is cosmopolitan and grows easily and everywhere, and its use is not prohibited. Especially the above-ground parts of *Ephedra distachya* L. such as stem, seeds and flowers are used among the public. For this reason, methanol and water extracts of these dried and powdered parts were prepared and evaluated for all chemical components by GC-MS method. According to the GC-MS data obtained, hallucinogenic active ingredients were found only in both extracts of the body part. In addition, determining the potential active substances of herbal extracts is very important for both public health and criminal perspective.

Keywords: Hallucinogenic substances, addiction, herbal ingredients, *Ephedra distachya*

*Bu makale Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kriminalistik Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Handan UYSAL danışmanlığında hazırlanmış olan "Halk Arasında Kullanılan Kozmopolit ve Halüsinojenik Bitkilerin Toprak Üstü Kısımlarına Ait Etken Maddelerin GC-MS Yöntemiyle Belirlenmesi" isimli yüksek lisans tezinden çıkarılmıştır.

1. Giriş

Yunanca uyku anlamında "narke"den gelen ve İngilizce'ye "narkotik" olarak geçen uyuşturucu sözcüğü, uyuşturma özelliği olan, uyuşturan, duymaz hale getiren demektir. En genel tanımı ile uyuşturucu maddeler, kullanan kişilerde merkezi sinir sistemini etkileyerek, his ve davranışlarda değişiklik ve dengesizliklere sebep olan, uzun süreli kullanım sonucunda alışkanlık ve bağımlılığa, bağımlılık sonrası yokluğu durumunda psikolojik ve fiziksel tepkilere yol açan, kişisel ve toplumsal yönden ekonomik ve sosyal çöküntü oluşturan maddelerdir (İçişleri Bakanlığı, Emniyet Genel Müdürlüğü Yayını 1994). İster organik ister sentetik olsun tüm uyuşturucu maddelerin kullanılma sebepleri arasında kişilerin baskılardan, kederden ve sıkıntıdan kurtulmak, gerçeklerden uzaklaşarak kendini iyi hissetmek, toplumdan kendini soyutlamak ve dünyayı tozpembe görmek isteği karşımıza çıkmaktadır. Kişilerin bu isteklerini karşıladıkları maddeleri ise narkotikler (morfin, eroin gibi), uyutucular (alkol gibi), uyarıcılar (kokain, kafein ve nikotin gibi) ve hayal gördürücüler (esrar, liserjik asit dietilamid, fensiklidin ve psilosibin gibi) olmak üzere dört ana gruba ayırmak mümkündür (Bayer 2003).

Küresel bir tehdit olan uyuşturucu maddeler, her geçen gün karşımıza farklı etki ve içerikleriyle çıkmaktadır. Uyuşturucu kullanımı özellikle ergenler ile genç yetişkinler arasında çok yaygın ve tüm ülkeler için ciddi bir sorun haline gelmiştir (Bora 2007). 2021 yılında yayımlanan Dünya Uyuşturucu Raporu'na göre, dünya genelinde her 17 kişiden bir kişi uyuşturucu madde kullanmaktadır. Yine aynı raporda hint kenevirinden elde edilen maddelerin dünya sıralamasında 192 milyon kullanıcı ile birinci sırada olduğu, eroin, morfin, kodein gibi narkotiklerin son on yılın en ölümcül maddesi olarak ölüme sebebiyet verdiği ve uyuşturucu kaynaklı ölüm olaylarının %71 oranında arttığı belirtilmiştir (World Drug Report 2020). Ayrıca yine bu raporda, gelişmekte olan ülkelerdeki ergen ve genç yetişkinlerin uyuşturucu madde kullanım oranının gelişmiş ülkelere göre daha hızlı bir artış gösterdiğine de işaret edilmektedir. 2023 yılında yayımlanan Türkiye Uyuşturucu Raporu'nda ise en dikkat çekici nokta olarak madde bağımlı ölümlerin cinsiyete göre dağılımları incelendiğinde; 2020 yılında ölenlerin %93,3'ünün (293) erkek, %6,7'sinin (21) kadın, 2021 yılında %90,7'sinin (245) erkek, %9,3'ünün (25) kadın ve 2022 yılında ise %89'unun (219) erkek, %11'inin (27) kadın olduğu belirlenmiştir. Toplam nüfusa göre bu sayısal dağılım çok düşükmüş gibi görünse de özellikle kadınlar arasında da ölümlerle sonuçlanan madde bağımlılığı oranının artmış olması oldukça endişe vericidir (Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (TUBİM) 2023).

Günümüzde uyuşturucu maddelere bağımlılık konusu tüm ülkelerin üzerinde önemle durması gereken sorunların başında gelmektedir. Hemen hemen her toplumda çok sayıda insan gerçeklerden kaçmak, sıkıntılardan ve tükenmişlik sendromundan kurtulmak için uyuşturucu maddeleri kullanmakta ve bu maddelerin zararlı etkilerinin bilinmesine rağmen ne pahasına olursa olsun almak istemektedirler (Akbulut 2011). Ayrıca, dünyanın dört bir köşesinde uyuşturucu madde kullanımı ve emniyet güçleri

tarafından yakalanan maddeler hem miktar bakımından hem de çeşitlilik açısından çok büyük artışlar göstermektedir. Bu çeşitlilik ve miktar bakımından artışlar tüm ülkelerde görülsede ülkelerin içinde buldukları jeopolitik konumun ve ekonomik gelişmişliğin, en önemlisi ergen ve genç nüfus oranının madde kullanımına etkisi büyüktür (Bora 2001). Uyuşturucu madde kullanımı yalnızca kişide bağımlılıkla ilgili problem yaratmamaktadır. Aynı zamanda başta kendi ailesi, çevresi ve yaşadığı toplumda da birçok problemlere sebep olmaktadır. Uyuşturucunun yarattığı problemlerin başında kişisel eğitim, sosyal iletişim, kişinin yaptığı işin kalitesi, yaşam tarzına ait olumsuz değişiklikler ile eski sağlıklı hayatı bırakıp maddeyi almak ve kullanmak için şiddet ve suç içeren bir hayata geçiş ve özellikle sosyo-ekonomik düzeyi düşük kişilerde gözlenen ekonomik çöküş gelmektedir. Şu hiçbir zaman unutulmamalıdır ki uyuşturucu maddeler, suç ve suçlular ile sağlıksız ve problem dolu bir hayatla beraber anılagelmektedir. Her geçen gün yeni bir türü sentezlenen ve kullanımı daha yaygınlaşan bağımlılık yapıcı maddeler ile topyekün savaş, ulusal ve uluslararası devam etmektedir. Bu nedenle yasa dışı uyuşturucu ile mücadelenin arz boyutuyla kurumlar arasında ortaklaşa ve güçlü bir iş birliği devam ederken talep boyutunun da engellenmesi için kanuni müeyyidelerin daha etkin uygulanması gereklidir.

Özellikle Dünyada ve Ülkemizde kozmopolit ve kolay ulaşılabilir olan, kullanımları yasal olarak suç unsuru teşkil etmeyen, bu nedenlerle halk arasında gövde, yaprak, çiçek, tohum ve meyve gibi toprak üstü kısımları çiğneme, sarıma ya da demleme şeklinde keyif verici olarak kullanılan Scrophulariaceae (sıracı otugiller), Verbenaceae (mine çiçeğigiller) ve özellikle Solanaceae (patlıcangiller) gibi farklı familyalara ait bitki türleri bulunmaktadır (Bayam 2021; Uysal ve Bayam 2021). Sunulan bu çalışmaya konu olan Efedraceae familyasına ait türlerin de halk arasında fitoterapi amacıyla geçmişten günümüze kullanıldığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Saygı 1982; Pederson 1994; Hutchinson ve Andrews 1995). Ancak bitkiler Etnobotanik (insanların bitkilerle çok yönlü ilişkisini sistematik olarak araştıran disiplinler arası bir bilim dalı) bakımından değerlendirildiği zaman yalnızca beslenme ve sağlığı korumaya yönelik olarak değil bitkisel kafa yapıcı maddeler (herbal highs) ve hayal gördürücüler (halüsinojenler) bakımından da değerlendirilmektedir. Dünyada İspanya, Fransa'nın batı kıyıları, Avrupa'nın güneyi, Sicilya, Adriyatik ve Asya'nın kuzeydoğusuna kadar olan bölgelerde yayılım gösteren Efedraceae familyasına ait türler, Ülkemizde de Trakya ve Akdeniz kıyıları, Güney Marmara, Doğu Karadeniz, Yukarı Sakarya, Konya, Yukarı Fırat, Yukarı Murat-Van, Artvin, Kars ve Ağrı dolaylarında doğal olarak yetişen üç tür (*Ephedra distachya*, *E. foeminea*, *E. major*) ile temsil edilmektedir. Bu türlerden birisi olan *E. distachya* L. (Ebu Cehil çalısı), yaklaşık 25 ila 50 cm yüksekliğinde, pek azı 1 m'ye kadar boylanan, sık dallı, dik ve yatay yükselebilen bir çalı olarak tanımlanmaktadır. Mayıs-haziran aylarında sarı renkli çiçekler açan bu bitkinin meyveleri bezelye büyüklüğünde, yuvarlak ve kırmızı renkte olup ağustos-eylül ayları arasında olgunlaşmaktadır (Şekil 1). Ayrıca *E. distachya*'nın kuvvetli kökleri, toprağın metrelerce derinine

kadar inebilmektedir. Bu nedenle toprağı tutarak rüzgar erozyonun önlenmesi amacıyla ve az su tükettiği için de kuraklığa karşı kullanılan değerli bir bitkidir.

Sunulan bu çalışmada, Ülkemizde genellikle otsu ve çalimsı formlarda bulunan, kozmopolit ve kolay ulaşılabilir olan, kullanımları yasal olarak suç unsuru teşkil etmeyen, bu nedenlerle halk arasında özellikle toprak üstü kısımları kullanılan *E. distachya*'nın gövde, tohum ve çiçek kurularından metanol ve su ekstraktları elde edilerek halüsinojenik etken maddelere sahip olup olmadığı Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS) yöntemiyle belirlenmiştir.



Şekil 1. Doğal ortamda *E. distachya* L. türünün çiçek ve meyveleri

2. Materyal ve Metot

2.1. Bitkinin Toplanması, Metanol ve Su Ekstraktlarının Hazırlanması

Deneysel çalışmalarda kullanılan *E. distachya*, Mersin ili Erdemli ilçesinden (36°36'10.7"K, 34°14'01.3"D) Temmuz ayının son haftasında ve çiçeklenme döneminde toplanmıştır. Bu bitki doğrudan güneş görmeyen karanlık bir ortamda kurutma kağıtları arasına konulup, oda sıcaklığında (22-24°C), sık sık kurutma kağıtları değiştirilerek ve çürüyen kısımları ayıklanarak

kurutulmuştur. Bu çalışma için kurutulmuş olan *E. distachya* bitkisinin çiçek, tohum ve gövdesinin her bir bölümü ayrı ayrı olacak şekilde toz haline getirilerek paketlenmiştir (Şekil 2a-c).



Şekil 2. *E. distachya* türüne ait a) gövde, b) çiçek ve c) tohum kurularının ayrı ayrı öğütülmüş ve paketlenmiş hali.

Metanol ekstraktı için öğütülmüş *E. distachya*'nın gövde, tohum ve çiçek kuruları ayrı ayrı olmak üzere hassas terazi ile yaklaşık 25 g olacak şekilde tartılıp 200 ml metanol ile ekstrakte edilmiştir. 24 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra, önce süzgeç kâğıdından geçirilerek süzülmüş daha sonra filtrelili enjektörden geçirilerek çözelti miktarı artırılmıştır. Elde edilen süzöntü, 200°C sıcaklıkta Etüv'de vakumlu fırınlanma yöntemiyle 12 saat bekletildikten sonra metanolden ayrıştırılarak daha derişik ve yoğunlaştırılmış olarak bitkisel ekstre elde edilmiştir. Bu ekstre, steril boş cam şişeye aktarılarak kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır. Elde edilen bitki ekstresi kısaca "EDmet" olarak isimlendirilmiştir.

Su ekstraksiyonu için de yine öğütülmüş *E. distachya*'nın gövde, tohum ve çiçek kuruları kullanılmış ve ayrı ayrı düzeneklerde üzerlerine 70-80°C sıcaklıktaki saf su dökülüp sıcaklık oda sıcaklığı (22-24°C) seviyesine düşüncüye dek Ultrasonik Banyo Cihazı içinde bekletilmiştir. Daha sonra soğuyan karışım, süzgeç kâğıdından geçirilerek süzülüş bitki çözeltisi elde edilmiştir. Su ekstresinde bulunan suyu uzaklaştırmak amacıyla da 150-200°C sıcaklıkta etüv kullanılmış ve vakumlu fırınlanma yöntemiyle (12 saat) daha derişik ve yoğunlaştırılmış ekstre elde edilmiştir. "EDsu" olarak isimlendirilen bu ekstre de steril boş cam şişeye alınmış ve kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Sunulan bu çalışmada GC-MS analizi, hem gövde hem de tohum ve çiçek için ayrı ayrı yapılmıştır. Ancak halüsinojenik özelliğe sahip bileşenler yalnızca gövde için hazırlanan EDmet ve EDSu ekstraktlarında bulunmuştur. Bu nedenle Bulgular kısmında sunulan veriler yalnızca *E. distachya*'nın gövde kısmına aittir.

2.2. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS) Analizinin Yapılması

GC-MS, organik ve biyokimyasal karışımların analizi için kullanılan analitik bir yöntemdir. Bu uygulamada, önce kromatografik kolondan çıkan bileşikler için ayrı ayrı spektrumlar toplanır. Daha sonra bu spektrumlar işlenmek

amacıyla bir bilgisayarda depolanır. Yapısında birçok bileşeni barındıran ve anlaşılmasını sağlayan GC-MS yönteminde iki cihaz aynı anda ve bir arada çalışarak gerekli analizler yapılmaktadır. GC-MS'in kütle spektrometresi (MS) etabında, gaz kromatografisi (GC) sütunundan çıkan bileşikler elektron etkisi ile parçalanır. MS, örnek molekülleri elektrikle şarj ederek bir manyetik alan boyunca hızlandırıp molekülleri yüklü parçalara ayırır ve farklı yükleri tespit ederek maddeleri tanımlar. Burada GC ile örneklerdeki bileşenler birbirinden ayrılırken MS ile de her bir bileşen ayrı ayrı tanımlanmaktadır (Tutanç 2009).

Araştırmamızda kullanılan *E. distachya*'ya ait metanol ve su ekstraktlarındaki bileşenlerin tanımlanması için Agilent 6890N Network GC sistem, 5977B kütle spektroskopisi dedektörü, Agilent 7693 serisi otosampler ve HP-5 MS kolon kullanılarak (30 m x 0,250 mm ID, film kalınlığı 0,25 Mm); 1 ml/dk akış hızı, splitless enjeksiyon hacmi ve sıcaklık programı 50°C de 1 dakika, 20°C yükselterek 100°C de 1 dakika bekletilerek, dakikada 10°C yükselterek 180°C de 1 dakika bekletilerek, dakikada 5°C yükselterek 220°C de 5 dakika bekletilerek, dakikada 10°C yükselterek 300°C de 5,5 dakika bekletilerek uygulanan fırın sıcaklık programı ile analizler gerçekleştirilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. EDmet Ekstresine Ait GC-MS Analiz Bulguları

EDmet'in GC-MS analizi sonucu, analizatörün kütüphanesinde bulunan bileşenler ile benzerlik oranı yüksek olan beş (5) farklı bileşen tespit edilmiş olup bu kimyasal maddeler; %35 5-Methyl-2,4-imidazolidinedione (Pik1), %28 N-Allyl-2,5-dimethoxy-4-iodophenethylamine (Pik2), %78 Pseudoephedrine (Pik5), %76 Dihydrobenzofuran (Pik7) ve %97 Palmitic Acid (Pik8)' dir (Tablo 1). EDmet'e ait GC-MS kromatogramı da Şekil 3'de verilmiştir.

Bu bitkisel ekstrakta ait olan N-Allyl-2,5-dimethoxy-4-iodophenethylamine**, Pseudoephedrine** ve Dihydrobenzofuran** bileşenlerinde bulunan ikame fenetilamin, merkezi sinir sistemini etkileyerek halüsinojenik etkiye sebep olan bileşen olarak belirlenmiştir (Tablo 1). EDmet'in GC-MS analizinde 5.pik'de ortaya çıkan Pseudoephedrine, hem belirli bitki

türlerinde doğal olarak bulunan bir alkaloid hem de ticari amaçla üretilen kimyasal bir bileşendir. Oldukça etkili bir uyarıcı olarak değerlendirilen bu maddenin yüksek miktarlarda alınması halüsinojenik etkilere ve alımına devam edilmesi ile özellikle narkotikler gibi psikoz ataklarının ortaya çıkmasına neden olabilmektedir.

3.2. EDsu Ekstresine Ait GC-MS Analiz Bulguları

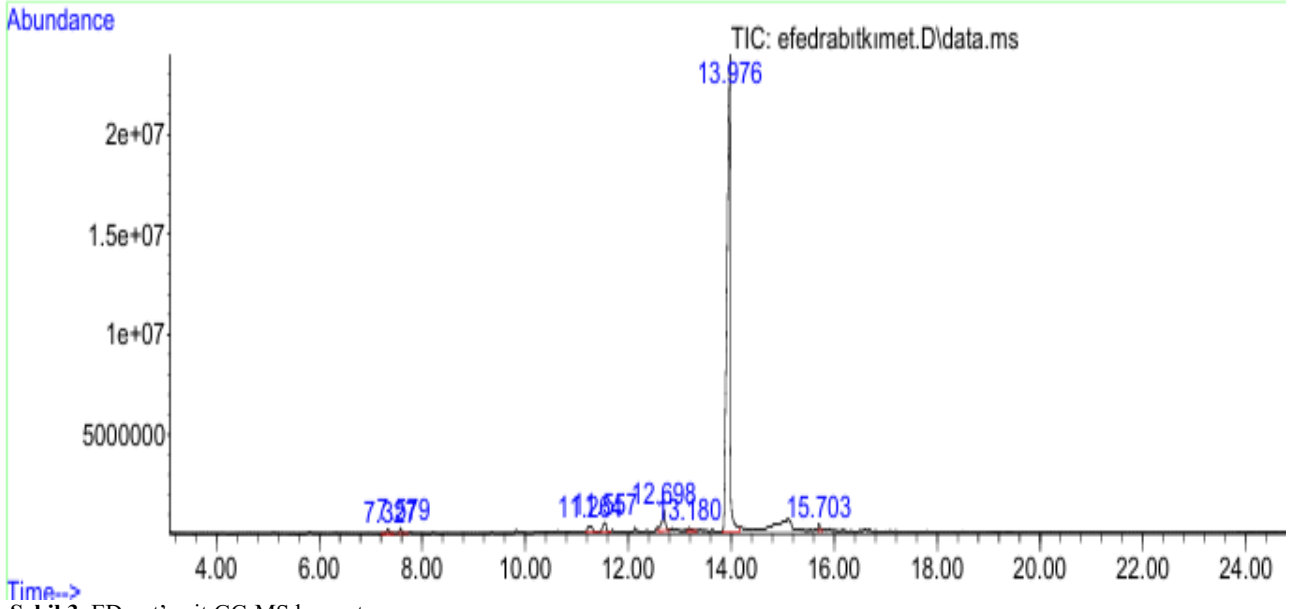
EDsu ekstraktının GC-MS analizi ile de en yüksek benzerlik oranı %43 olan tek bir bileşen tespit edilmiş olup bu kimyasal madde Des-N-dihydrosolasodine** (Pik1)'dir (Tablo 2). EDsu'ya ait GC-MS kromatogramında da bu bileşenin verdiği Pik Şekil 4'de görülmektedir. EDsu'da bulunan Des-N-dihydrosolasodine isimli bileşen, bir çeşit toksik alkaloid olup EDmet'de bulunan N-Allyl-2,5-dimethoxy-4-iodophenethylamine, Pseudoephedrine ve Dihydrobenzofuran bileşenleri gibi halüsinojenik özelliğe sahip bir bileşen olarak tanımlanmıştır. Des-N-dihydrosolasodin isimli kimyasal bileşen, aynı zamanda Solanaceae familyasında da bulunan solanin, solasodinin ve solamarjin alkaloidleri ile glikoalkaloid türevlerinden birisi olarak merkezi sinir sistemi üzerinde çeşitli uyarıcı etkilere sebep olabilecek bir madde olarak değerlendirilmiştir.

Ülkemizde uyuşturucu ile mücadelede halen yürürlükte olan kanun, 12/6/1933 tarihinde yürürlüğe giren 2313 sayılı "Uyuşturucu Maddelerin Murakabesi Hakkında Kanun"dur. Bu kanunun yürürlüğe girdiği 1933 yılında esrar, morfin, eroin, kokain gibi klasik uyuşturucuların bulunduğu toplam 10 ana madde, yasal kısıtlılığa altına alınmıştır. Fakat zaman içinde klasik uyuşturuculardan başka maddelerin de suistimalinin görülmesi üzerine ve uluslararası anlaşmaların gereği olarak Bakanlar Kurulu Kararları ile 2313 sayılı kanuna eklemeler yapılmıştır. Bu eklemelerden ilki 7 uyuşturucu maddenin daha yasal kısıtlılığa altına alındığı 30.03.1961 tarih ve 5/990 sayılı Bakanlar Kurulu Kararıdır. 1962-1982 yılları arasında 32 uyuşturucu madde daha kanun kapsamına alınarak bu konu ile ilgili mücadeleye etkin şekilde devam edilmiştir/edilmektedir. Bu süreç 1986, 1988, 1996, 1998, 2004, 2008, 2009, 2011, 2012, 2013 ve 2014 yıllarında çıkarılan kararnamelerle devam ederek yasal kısıtlılığa altına alınan madde sayısı günümüzde 428'e ulaşmıştır.

Tablo 1. GC-MS Analizi ile Tespit Edilen EDmet'e Ait Bileşenler

Pik	Alınma Zamanı	% Alan	% Benzerlik Oranı	Bileşenler
1	7.33	0.62	35	5-Methyl-2,4-imidazolidinedione
2	7.58	0.63	28	N-Allyl-2,5-dimethoxy-4-iodophenethylamine**
5	12.70	4.08	78	Pseudoephedrine**
7	13.98	2.04	76	Dihydrobenzofuran**
8	15.70	0.57	97	Palmitic Acid
Toplam				5

**Halüsinojenik bileşenler

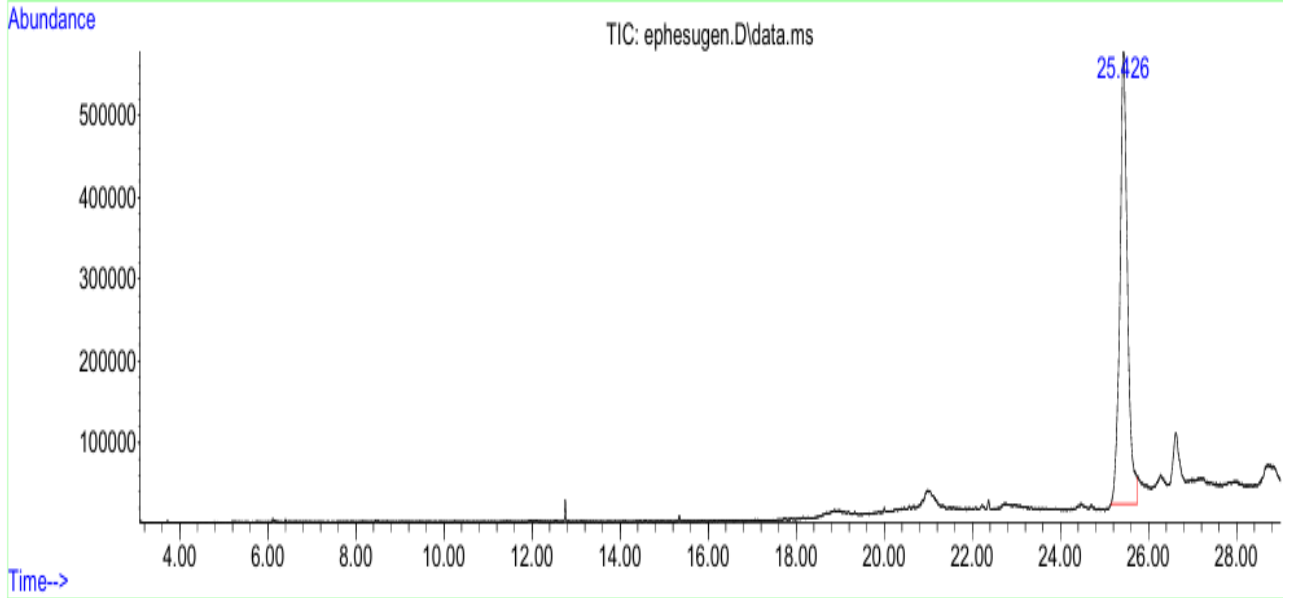


Şekil 3. EDmet'e ait GC-MS kromatogramı.

Tablo 2. GC-MS Analizi ile Tespit Edilen EDsu'ya Ait Bileşenler

Pik	Akılınma Zamanı	% Alan	% Benzerlik Oranı	Bileşenler
1	25,43	100	43	Des-N-dihydrosolasodine**
Toplam				1

**Halüsinojenik bileşen



Şekil 4. EDsu'ya ait GC-MS kromatogramı.

Geçmişten günümüze uyuşturucu veya alkolün etkisi ile kişiler halüsinasyon görebildikleri gibi bağımlıların bu maddeleri kullanmayı aniden bırakmaları da benzeri durumlara neden olabilmektedir. Halüsinasyonlar genelde görsel varsani olduğu gibi dokunma, koklama veya işitme duyularını da etkileyebilmekte ve çoğu zaman gerçeklik algısında yanılsamalar ortaya çıkabilmektedir (Yılmaz 2017). Esrar, eroin, morfin ve kokain gibi klasik uyuşturucu maddelerin yanısıra uyuşturucu madde olarak kabul edilen

bir maddenin molekül yapısında küçük eklemeler veya çıkartmalar yapılarak designer drugs (yeni tasarlanan) olarak tanımlanan ve kanun kapsamında yer almayan madde/maddeler de kişisel ve toplumsal bağlamda maddi ve manevi problemleri beraberinde getirmektedir. Bu küresel problemin bir ayağını da son derece masum görünen ancak kafa yapıcı bileşenleri bakımından halk arasında hem kolay ulaşılabilir olmaları hem de konuya ilişkin olmak üzere kullanımı durumunda herhangi bir kanuni müeyyide

bulunmaması gibi nedenlerle uyuşturucu ve halüsinojenik etkileri bakımından kullanılan bitkiler oluşturmaktadır. Bu tür bitkiler çoğu kere boş araziler, bahçeler, yol kenarları gibi doğal koşullarda kendiliğinden yetişebildiği için üretilmeleri bakımından da her hangi bir sınırlayıcılık bulunmamaktadır.

Sunulan bu çalışmada kullanılan *E. distachya*'nın çiçek ve tohum kısımlarına ait halüsinojenik özelliğe sahip herhangi bir bileşen belirlenmemiştir. Ancak bu bitkinin gövde kısmına ait GC-MS analizinde EDmet için N-Allyl-2,5-dimethoxy-4-iodophenethylamine, Pseudoephedrine ve Dihydrobenzofuran ile EDsu için de Des-N-dihydrosolasodine halüsinojenik bileşenler olarak tespit edilmiştir. *Efedra*, Hill (1951) tarafından zehirli bir bitki olarak tanımlanmıştır ve metanol ekstresinde bulunan Pseudoephedrine diaforetik (terletici), antienflamatuvar (yangıyı/iltihabi reaksiyonu ve ödemi azaltıcı), antipiretik (ateş düşürücü) ve sedatif (sakinleştirici) etkilerinden dolayı hastalıkların iyileştirilmesi amacıyla uzakdoğuda yaklaşık 5000 yıl öncesinden beri tıbbi olarak kullanılmaktadır (Saygı 1982; Hikino *et al* 1983; Hutchinson ve Andrews 1995). Ancak *Efedra*'dan elde edilen efedrin'in saflaştırılmasıyla metamfetamin ham maddesi elde edilebildiği için de bu bitki Pederson (1994) tarafından "adli olaylarda karşılaşılabilecek bitkisel türlerden birisi" olarak tanımlanmıştır. Pseudoephedrine dışında *Efedra*'nın metanol ekstresinde bulunan N-Allyl-2,5-dimethoxy-4-iodophenethylamine, Dihydrobenzofuran ve *Efedra*'nın su ekstresinde bulunan Des-N-dihydrosolasodine isimli kimyasal bileşenler de zehirli alkaloidler olup yapılarında bulunan ikame fenetilamin ile merkezi sinir sistemi üzerinde çeşitli uyarıcı etkileri ile halüsinojenik olarak kabul edilmektedirler.

Bayer (2003)'e göre, hayal gördürücüler olarak da bilinen ve bitkilerden elde edilen halüsinojenik maddeler, belirli bir dozda kullanıldığında kullanıcının gerçekte orada bulunmayan şeyleri görmesine, duymasına ve hissetmesine sebep olarak kişiyi varsaniler ile gerçek dünyadan uzaklaştırıp hayal alemine daldırırlar. Halüsinojenik maddelerin en önemli örneklerinden olan liserjik asit dietilamid (LSD) de de benzeri varsaniler gözlenmektedir. Bu tip maddelerin vücutta yarattığı etkiler ise genellikle kullanılan doz, kullanım sıklığı, kullanıcının yaşı, beraberinde alkol veya başka ilaç alınıp alınmadığı gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Hatta tüm bu zararlı ve bağımlılık yapıcı maddeler merkezi sinir sistemini, sindirim sistemini, karaciğer ve böbrek gibi hayati organları etkilemekte ayrıca kanser, kangren ve benzeri birçok ölümcül hastalığa da sebep olmaktadır (Akbulut 2011).

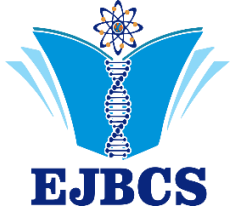
4. Sonuç

Yasal kısıtlamaların olmaması sebebiyle uyarıcı, uyuşturucu ve halüsinojenik etkili olarak değerlendirilen bitki türleri, içerdikleri etken maddeler sebebiyle kronik kullanımlara bağlı olarak insanlarda pek çok hastalığa sebep olabilmektedir. Bu bitkilerin insanlara verdiği zararlar düşünüldüğünde, resmi kurumlar tarafından konuya ilişkin

yeni düzenlemelerin yapılabilmesi ve yasal tedbirlerin alınabilmesi gerekli görülmektedir.

Kaynaklar

- Akbulut İ. 2011. Ülkemizde uyuşturucu maddeler sorunu. J Istanbul Univ Law Fac, 55:111-142.
- Bayam H. 2021. Halk Arasında Keyif Verici Olarak Kullanılan Bazı Kozmopolit Bitki Türlerinin Uyuşturucu Özelliklerinin ve Genotoksitesinin Belirlenmesi Üzerine Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Bayer M. 2003. Olay yeri İnceleme Kriminal Laboratuvar Analizleri. Songür Yayıncılık-Eğitim Hizmetleri, 338-415, Ankara.
- Bora T. 2007. Yakalanan Ekstazi Tabletlerinin Nitel, Nicel ve Kaynak Belirlemede Kullanılan Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Bora T. 2001. Kromatografik ve Spektroskopik Yöntemlerle Yasadışı Eroinlerin Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır.
- Hikino H. Ogato M. Konno C. 1983. Structure of feruloylhistamin a hypotensive principle of *Ephedra* roots. Planta Med. 48, 108-110.
- Hill FA. 1951. Economic Botany, 2nd ed., Mc. Graw Hill Book Company Inc., New York, p. 251.
- Hutchinson K. Andrews KA. 1995. The use and availability of *Ephedra* products in the United States. Microgram, 28(8), 256-263.
- İçişleri Bakanlığı, Emniyet Genel Müdürlüğü Yayını. 1994. Uyuşturucu Madde Olayları Genel Değerlendirmesi. Ankara.
- Pederson L. 1994. Metamphetamine synthesised from *Ephedra* extract encounter. Microgram 27(10), 241.
- Saygı Ş. 1982. Organik Baz Yapısındaki Stimülan İlaçların (Doping Maddeleri) İdrardan İzolasyonları, Nitel ve Nicel Analizlerinin Kromatografik Yöntemlerle Araştırılması. Doktora Tezi, A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Tutaç L. 2009. Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi ile Eroin, Kokain, Amfetamin Grubu Maddelerin Birlikte Analizi için Yöntem Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Uysal H. Bayam H. 2021. Keyif verici özelliği ile halk arasında kullanılan *Hyoscyamus niger* L.'nin genotoksik etkilerinin belirlenmesi. TÜBAV,14(2): 1-12.
- Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (TUBİM). 2023. Türkiye Uyuşturucu Raporu. EGM Yayın Katalog No: 763 NSB Yayınları: 52, Yayın No:7(1), Baskı 105, Ankara.
- Yılmaz E. 2017. Halüsinasyon: Çeşitleri ve Nedenleriyle Beynin Gizemli Oyunu, Halüsinasyon: Çeşitleri ve Nedenleriyle Beynin Gizemli Oyunu. Şukela List (sukelalist.com), (Erişim tarihi: 21.02.2024)
- World Drug Report, Drug Enforcement Administration. Drugs of Abuse-A DEA Resource Guide / 2020 Edition.s.48-49-94 (2020).Web. https://www.dea.gov/sites/default/files/2020-06/Depressants_2020.pdf (Erişim tarihi: 20 Ekim 2023).



Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

Journal homepage: www.dergipark.org.tr/ejbc



Kırmızı pancar (*Beta vulgaris* L.): Besinsel bileşimi, antioksidan özellikleri ve sağlık faydaları

Atiye Kaynak*^{ID}, Zehra Nur Başkan, Berna Satış, Muhammet Doğan^{ID}

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Karaman, Türkiye

*Corresponding author : atiye.kynk0@gmail.com
Orcid No: <https://orcid.org/0009-0004-3038-9835>

Received : 23/11/2023
Accepted : 12/01/2024

To Cite / Atf için: Kaynak A, Başkan ZN, Satış B, Doğan M. 2024. Kırmızı pancar (*Beta vulgaris* L.): Besinsel bileşimi, antioksidan özellikleri ve sağlık faydaları. Eurasian J Bio Chem Sci, 7(1):52-61 <https://doi.org/10.46239/ejbc.1395054>

Abstract: Kırmızı pancar, *Beta vulgaris* L. adlı bitkiden elde edilen bir sebzedir. Besin değeri oldukça yüksek olan kırmızı pancar, çeşitli vitamin, mineraller, lifler ve fitokimyasallar içerir. Kırmızı pancarın, başlıca besin öğeleri arasında folat, demir, potasyum, C vitamini, betanin (kırmızı rengi veren bir pigment), betalainler, betasianinler ve antioksidanlar yer alır. Kırmızı pancar, özellikle betalainler ve betasianinler gibi antioksidan bileşikleri içerir ve antioksidan özelliği açısından en güçlü on sebze arasında yer alır. Kırmızı pancar, mükemmel antioksidanlar olarak da bilinen rutin, epicateşin ve kafeik asit gibi yüksek oranda biyoaktif fenolikler içerir. Bu antioksidanlar, hücre hasarına neden olan serbest radikallerle savaşarak oksidatif stresi azaltabilirler. Sadece mineraller, besinler ve vitaminler açısından zengin olmakla kalmayıp aynı zamanda çeşitli tıbbi özelliklere sahip benzersiz fitobiyokimyasallere sahip olduğu için mükemmel bir besin takviyesidir. Kırmızı pancarda bulunan betanin, özellikle antioksidan özellikleri ile bilinir ve vücudu serbest radikallere karşı koruyabilir. Kırmızı pancar iyi bir sağlık geliştirici, hastalık önleyici ve tedavi edici olarak bilinir. Bunlardan bazıları kardiyovasküler sağlık, antimikrobiyal aktivite, böbrek fonksiyonunu iyileştirme, egzersiz performansını artırma, anti-inflamatuar etkiler, karaciğer sağlığı ve kanser riskini azaltmadır. Bu derleme çalışmanın amacı kırmızı pancarın besin içerikleri, antioksidan özellikleri ve genel sağlık yararlarının sunulmasıdır. Kırmızı pancarın hastalıklar üzerindeki etkilerini ve antioksidan aktivitesini belirlemek için daha fazla deney ve çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Beslenme ve diyetetik, Fonksiyonel besin, Kırmızı pancar, Sağlıklı beslenme

*Red beet (*Beta vulgaris* L.): Nutritional composition, antioxidant properties and health benefits*

Abstract: Red beet is a vegetable obtained from the plant called *Beta vulgaris* L. Red beet, which has a very high nutritional value, contains various vitamins, minerals, fibers and phytochemicals. The main nutrients of red beets include folate, iron, potassium, vitamin C, betanin (a pigment that gives the red color), betalains, betacyanins and antioxidants. It contains antioxidant compounds, especially betalains and betasianins, and is among the ten most powerful vegetables in terms of antioxidant properties. It contains high amounts of bioactive phenolics such as rutin, epicatechin and caffeic acid, which are also known as excellent antioxidants. These antioxidants can reduce oxidative stress by fighting free radicals that cause cell damage. It is an excellent dietary supplement as it is not only rich in minerals, nutrients and vitamins, but also has unique phytoconstituents with various medicinal properties. Betanin, found in red beets, is particularly known for its antioxidant properties and can protect the body against free radicals. Red beet is known as a good health promoter, disease preventive and therapeutic. Some of these include cardiovascular health, antimicrobial activity, improving kidney function, increasing exercise performance, anti-inflammatory effects, liver health, and reducing cancer risk. The aim of this review study is to present the nutritional contents, antioxidant properties and general health benefits of red beet. More experiments and studies are needed to determine the effects of red beet on diseases and its antioxidant activity.

Keywords: Antioxidant, Nutrition and dietetics, Functional food, Red beet, Healthy nutrition

1. Giriş

Kırmızı pancar (*Beta vulgaris* L.) renkli, suda çözünür ve nitrojen pigmentlerine sahiptir (Spiegel ve ark. 2021). Kırmızı pancarın ana üretim yerleri Avrupa'nın kuzeyi ve güneyi olarak bilinmektedir. Türkiye'de en çok Ege ve Marmara bölgelerinde üretilmektedir (Gül ve ark. 2021). Kırmızı pancarın çoğunluğu (%85) işleme için kullanılırken yaklaşık %30'u işleme sırasında kaybedilmektedir (El-Beltagi ve ark. 2022). Günümüzde pancar ağırlıklı olarak gıda için kullanılmaktadır (Vaitkevičienė ve ark. 2022). Pancar kökleri salata ve çorba yapımında kullanılırken pancardan turşu, reçel, şarap ve meyve suyu yapılabilir (Kumar ve Brooks 2018). Ayrıca pancarın kabukları ve sapları kullanılarak farmasötik ürünler, fonksiyonel ve yeni gıda ürünleri üretilmektedir. Bunun yanı sıra endüstriler için diğer faydalı bileşikleri geliştirmek için de yararlanılmaktadır (Vaitkevičienė ve ark. 2022). Aynı zamanda yüksek şeker içeriği nedeniyle tatlandırıcı olarak kullanılabilir ancak tadı ve aroması nedeniyle pek tercih edilmemektedir (Aznury ve ark. 2020). Ayrıca *B. vulgaris*'in yaprakları özellikle magnezyum, demir ve kalsiyum minerallerinden zengin ve sodyum açısından fakirdir (Mzoughi ve ark. 2019). Kırmızı pancar yüksek oranda sitrik, malik ve şikimik asit içerir. Ayrıca yüksek düzeyde ferulik asit içerdiği vardır (Okumuş 2016). Oldukça zengin bir folik asit ve amino asit içeriğine sahip olduğu da bildirilmiştir (Tomar ve ark. 2020). Pancar nitrat içeriği yönünden de zengin bir kaynaktır. Kırmızı pancar gibi nitrat içeren gıdaların tüketimi vücuttaki nitrat miktarını artırabilir (Eroğlu 2020). Nitrat gen ekspresyonunu indükleyerek biyogenez ve mitokondriyal etkinliği artırarak oksidatif enerji metabolizmasını destekleyebilir (Dominguez ve ark. 2018).

Kırmızı pancarın yapısında bulunan betalainler; betasiyaninler ve betaksantinler olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar (Nikan ve Manayi 2019). Kırmızı-mor renklere sorumlu betanin, prebetanin, izobetanin ve neobetanin gibi betasiyaninlerken, turuncu-sarı renklendirmeden sorumlu betaksantinler, vulgaksantin I, II ve indikaksantindir (da Silva ve ark. 2019). Betalainler kozmetik, ilaç ve gıda sektöründe kullanılmak üzere yerini almaktadır (Kaya ve Baysal 2016). Betalainler, antosiyaninlere kıyasla geniş renk yelpazesi, pH ve sıcaklıktaki değişikliklere karşı stabilite nedeniyle gıda bazı uygulamalar için uygundur (Butt ve ark. 2019). Kırmızı pancarda bulunan betanin Avrupa Birliği tarafından onaylanan gıda renklendiricisi olarak kullanılan tek betasiyanindir (da Silva ve ark. 2019).

Kırmızı pancarın betalain, fenolik bileşikler ve flavonoidleri içermesi nedeniyle doğal antioksidan kaynakları olduğu bilinmektedir (Kolaç ve ark. 2017; Spiegel ve ark. 2021). Yapılan deneyler, betalainlerin tek başına veya bir ekstraktın parçası olarak iyi antiradikal ve antioksidan aktivite sergilediğini göstermiştir (Spiegel ve ark. 2021). Antienflamatuar, anti-diyabetik, hepatoprotektif, hipotansif ve yara iyileştirici özelliklere sahip olduğuna inanılmaktadır (Mirmiran ve ark. 2020). Örneğin farelerde yapılan bir deneyde Tip 2 Diyabete ferulik asit tedavisi uygulandığında insülin duyarlılığını ve

hepatik glikojenezi iyileştirdiği bulunmuştur (Lorizola ve ark. 2021). Yapılan başka bir çalışmada pancar bileşenlerinin, vasküler hücre proliferasyonu ve anjiyogenez için yararlı olabileceği aynı zamanda metabolik stres ve inflamasyonu azaltmaya yardımcı olduğunu kanıtlanmıştır (Al-Harbi ve ark. 2021). Bazı araştırmalar da ise pancar veya türevi ürünlerin tüketiminin spor performansını, glisemik kontrolü ve kan basıncını iyileştirebildiğini gözlemlemiştir (Lorizola ve ark. 2021). Bu derleme çalışmasının amacı kırmızı pancarın besin içerikleri, antioksidan özellikleri ve genel sağlık yararlarının sunulmasıdır.

2. Besin İçeriği

Kırmızı pancarın 100 gramında bulunan enerji 43 kkal, su % 87.58, protein % 1.61, yağ % 0.17, karbonhidrat % 9.56, şeker % 6.76, lif % 2.8 'dir (Akan ve ark. 2021). Ayrıca triterpenler, seskiterpenoidler, karotenoidler, kumarinler, flavonoidler (tilirosid, astragalin, ramnositrin, ramnetin), betalainler ve fenolik bileşikler gibi güçlü antioksidanlar içerirler (Ceclu ve Nistor 2020). Kırmızı pancardaki doymamış yağ asidi miktarı, doymuş yağ asidine göre daha yüksektir. Kırmızı pancarın içeriğinde kolesterol ve trans yağ asidi bulunmamaktadır (Düker 2017).

2.1. Betalain

Betalainler, bitkilerde bulunan azotlu ve suda çözünür bileşiklerdir (Székely ve Mate 2022). Caryophyllales takımına ait 17 bitki ailesinin pigmentleridir. Betalainler hidrofildir ve hücrenin epidermal ve subepidermal dokularında birikir (Sadowska-Bartosz ve Bartosz 2021). Doğada 60 betasiyanin ve 33 betaksantin olmak üzere 90'dan fazla betalain bulunmuştur (Aykın-Dinçer ve ark. 2020). Kırmızı pancar betalain yönünden en zengin kaynaklardan biridir (Akan ve ark. 2019). Kırmızı pancarda 18 betasiyanin ve 12 betaksantin olmak üzere 30 betalain olduğu tespit edilmiştir (Sawicki ve ark. 2016). Betalain içeriğinden dolayı antioksidan yönünden en zengin 10 sebze arasında yer almaktadır (Akan ve ark. 2021). Kırmızı pancarın yapısında bulunan betalainler, betasiyaninler (kırmızı-mor renk maddesi) ve betaksantinler (sarı-turuncu renk maddesi) olarak sınıflandırılırlar (Yılmaz ve ark. 2019). Betasiyaninlerin ve betaksantinlerin konsantrasyon oranı pancar çeşitlerine göre değişmektedir. Betasiyanin doğal bir renklendirici madde olarak kullanılabilir (Lembong ve ark. 2019). Ayrıca oksidatif stresi ve serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltır (Székely ve Mate, 2022). Betasiyaninler 538 nm'de maksimum absorpsiyona, betaksantinler ise 480 nm'de maksimum absorpsiyona sahiptirler. Kırmızı pancar rengini içerdiği betalainden almaktadır. Kırmızı pancardan elde edilen pigmentlerin %80'den fazlası betasiyaninlerden, yani betanin ve bir betanin izomeri olan izobetaninden oluşur (Fu ve ark. 2020). Ticari olarak kullanılan ana betalain ürünü kırmızı pancardır. Çeşitli gıda sistemlerinde ve yenilebilir boya olarak kullanılmaktadır (Namazzadeh ve ark. 2022). Kırmızı pancardan elde edilen betalainlerin renklendirici olarak kullanım alanları; gıda, sanatsal, tekstil ve kozmetiktir (Yeler 2021). Gıdalarda yoğurt, dondurma,

hazır toz içecekler ve meyve jellerinde kullanılır (Okumuş 2016). Gıda endüstrisinde doğal ve zararsız pigmentler olarak kullanılmalarının yanı sıra tıbbi açıdan da önemlidir (Masih ve ark. 2019). İlaç endüstrisinde kırmızı pancar pigmentleri hem sıvı hem de katı ilaç formülasyonlarında renklendirici ajan olarak kullanılır (Kumar ve Brooks 2018). Betanin ve betalain bakımından zengin gıdaların LDL oksidasyonunun inhibisyonu, DNA hasarının önlenmesi, anti-enflamatuar, antiproliferatif ve antimikrobiyal aktiviteler gösterdiği tespit edilmiştir (Rodriguez-Amaya 2019).

2.2. Karotenoidler

Karotenoidler, 750'den fazla üye ile yeryüzünde doğal olarak bulunan ikinci en bol pigmenttir (Maoka 2020). Beslenme özellikleri açısından, A vitamini öncü bileşikler ve A vitamini olmayan öncü bileşikler olarak ikiye ayrılabilir (Liu ve ark. 2021). Kimyasal yapı için karotenler ve ksantofiller olarak iki gruba ayrılırlar. Karotenoidlerin çoğu 40 karbonlu bir yapıya sahiptir (Maoka 2020). Birçok meyve ve sebzenin sarı, turuncu ve kırmızı renginin kaynağıdır. İçerdiği konjuge çift bağların sayısına bağlı olarak renkleri değişiklik gösterir (Novoveská 2019). 100 gram kırmızı pancarda 87 µg β-karoten ve 6 µg lutein bulunmaktadır (Kasım ve Kasım 2019). β-karoten ve α-karoten gibi provitamin A karotenoidleri, gözler ve bağışıklık sistemi için gerekli olan A vitamini diyet öncüleridir (Sun ve ark. 2022). Lutein ve zeaksantin de göz hastalıkları üzerinde olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir (Sauer ve ark. 2019). Çalışmalar, karotenoid takviyesinin oksidatif stres belirteçlerini azalttığını göstermiştir (Rodriguez-Amaya 2019). Başka bir çalışma diyetle yer alan luteinin farelerde meme tümörü büyümesini engellediğini bildirmiştir (Lechner ve Stoner 2019).

2.3. Fenolik bileşikler

Fenolikler, bitkilerde pigmentasyon, büyüme, üreme ve patojenlere veya avcılara karşı direnç gibi çok çeşitli süreçlerde işlev görmektedirler (Abotaleb ve ark. 2020). Bitkilerin çok önemli ikincil metabolitleridir ve çok çeşitli özelliklere sahiptir (Platosz ve ark. 2020; Sevindik ve ark. 2017; Mohammed ve ark. 2018). Fenolik bileşikler sebzeler, meyveler ve içecekler gibi çeşitli kaynakların tüketimi ile vücuda alınabilirler (Grgić ve ark. 2020). Kırmızı pancarın yapısında flavonoidler ve fenolik asitlerin bulunduğu bilinmektedir (Faggio ve ark. 2017; Bangar ve ark. 2022). Kırmızı pancarın etli kısmı %13 fenolik bileşik içerirken kabuk kısmı %50 fenolik bileşik içermektedir (Maqbool ve ark. 2021). Fenolik bileşikler, oksidasyon zincir reaksiyonunun kırılmasına neden olan serbest radikallere bir hidrojen atomu ve/veya bir elektron vermesi nedeniyle antioksidan olarak kabul edilir. Aynı zamanda antimikrobiyal, anti-enflamatuar, antiproliferatif aktiviteler gibi biyoaktiviteler gösterirler ve çeşitli endüstriler tarafından büyük ilgi görürler (Albuquerque ve ark. 2021). Pişirme, vakum altında kurutma vb. işlemler gıdadaki toplam fenol değişimini etkiler (Pavlović ve ark. 2021). Yapılan bir çalışma sonucunda rendelenmiş pancar ve pancar suyunun uzun süreli soğuk depoda kalmasıyla

fenolik madde içeriğinin azaldığı bulunmuştur (Czyzowska ve ark. 2020).

2.3.1. Flavonoidler

Flavonoidler, 2-fenilkromanlar (flavonoller, flavonlar, flavanonlar, flavan-3-oller, antosiyanidinler ve yoğun tanenler) ve 3-fenilkromanlar (izoflavonoidler) olarak ikiye ayrılabilir (Kaurinovic ve Vastag 2019). Bitkilerin saplarını, yapraklarını, çiçeklerini ve meyvelerini renklendirmekten sorumlu ikincil metabolitlerdir. Flavonoidler sarı, turuncu, kırmızı, mor ve mavi gibi çeşitli renkler üretebilir, ancak bazıları renksizdir. (Székely ve Mate 2022). Pancarın yapısında bulunan flavonoid grupları flavonlar ve flavonollerdir (Faggio ve ark. 2017). Sarı flavonlar ve flavonoller antimikrobiyal ajan ve böcek tozlayıcılarını çeken pigmentler olarak işlev görmektedirler (Kaurinovic ve Vastag 2019). Flavonoidler oksidatif strese karşı koruyucu rol oynayarak antioksidan etki gösterirler. Aynı zamanda aterosklerozis, damar tıkanması ve tümör oluşmasına etki eden düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) yükseltgenip bozulmasını da önlemekte yardımcıdır (Düker 2017). Bunların yanı sıra flavonoid'in kanseri önleme gibi güvenilir pozitif faydalarının da doğrulandığı bilinmektedir (Mutha ve ark. 2021).

2.3.2. Fenolik asitler

Fenolik asitler, meyveler, sebzeler, baharatlar, tahıllar ve içecekler gibi çeşitli bitki kaynaklarında bulunan biyoaktif kimyasalların en önde gelen sınıfıdır (Rashmi ve Negi 2020). Fenolik asitlerin iki ana grubu olan hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asidin pancarda bol miktarda olduğu bulunmuştur (Bangar ve ark. 2022). Hidroksibenzoik asitler; protokatekuik, gallik, vanilik, gentisik ve şirnga asitlerini içerirken, hidroksisinnamik asitler; kafeik, sinapik, p-kumarik, o-kumarik, ferulik ve izoferulik asitleri içerir (Zhang ve ark. 2019). Pancarda 50-60 mmol/g fenolik asit içeriği saptanmıştır (Kathiravan ve ark. 2014).

Fenolik asitler, terapötik, kozmetik ve gıda endüstrilerinde düzenli olarak kullanılır. Aynı zamanda antioksidan, antimikrobiyal, antibakteriyel, antikanser ve anti-enflamatuar etki gösterdikleri bilinmektedir (Kumar ve Goel 2019). Fenolik asitlerin radikal yakalama kapasitesi için önemli olduğu ve antioksidan aktiviteyi azalttığı belirtilmektedir (Kaurinovic ve Vastag 2019). Yapılan bazı çalışmalarda fenolik asitlerin kansere karşı koruyucu etkisinin olduğu da belirtilmektedir (Kiokias ve ark. 2020). Fenolik asitten zengin beslenmenin bazı alerjilere karşı koruma sağladığı ve Alzheimer hastalığını yavaşlattığı da bildirilmiştir (Shahidi ve Ju Dong 2018).

2.4. İnorganik nitrat

Diyetle alınan nitrat ağızdaki bakteriler tarafından nitrite daha sonra çeşitli reaksiyonlarla nitrik oksite indirgenir (Carlström ve ark. 2018). Nitrik oksit (NO), vücutta mitokondriyal solunum, vazodilatasyon, anjiyogenez ve kas glikoz alımına katkıda bulunur (Wong ve ark. 2021). Yumru kökü ve yeşil yaprağı bulunan sebzeler, nitratın ana kaynağıdır (Aydın ve ark. 2019). Kırmızı pancarın

içeriğinde de nitrat bulunur ve nitrat bulunma oranları çoktan aza doğru sırasıyla yaprak sapı, yaprak, gövde, kök, yumru, soğan, meyve ve tohum şeklindedir (Akan ve ark. 2021). Kırmızı pancarın inorganik nitrat içeriği 250 mg/100 g olarak bilinmektedir (Capper ve ark. 2020). Pancar suyunun da çok yüksek miktarda nitrat (964 mg/L) içerdiği ve pancar nitratlarının yetişkinlerde hipertansiyonun düşürülmesinden sorumlu olduğu bulunmuştur (Merceddy ve ark. 2017). Kırmızı pancardaki inorganik nitratın endotel fonksiyonunu iyileştirdiği ve kardiyovasküler hastalıkları önlemede yardımcı olduğu da bildirilmiştir (Bahrami ve ark. 2021). Diyetle inorganik nitrat alımı dolaşımdaki nitrik oksit düzeylerini artırarak kas kasılmasının ve mitokondriyal solunumun iyileşmesine fayda sağlamıştır (Capper ve ark. 2020).

2.5. Vitamin ve mineraller

Kırmızı pancar suda çözünen vitaminler bakımından zengindir ve 100 gramında K vit. 280 mg, C vit. 10.01 mg, A vit. 2 µg, B1 vit. 0.031 mg, B2 vit. 0.027 mg, B3 vit. 0.331 mg, B5 vit. 0.145 mg, B6 vit. 0.067 mg, B9 vit. 80 µg şeklinde bulunmaktadır (Akan ve ark. 2021). A ve K vitamini açısından yüksek olan pancar yaprakları tüketilerek kan basıncı düşürülebilir (Bangar ve ark. 2022).

Pancar kökleri, Mn, Mg, K, N, P, Fe, Zn, Cu, Br ve Se içeriğinden dolayı iyi bir mineral kaynağıdır (Ceclu ve Nistor 2020). Pancarın 100 gramında 16 mg Ca, 325 mg K, 23 mg Mg, 40 mg P, 0.80 mg Fe, 78 mg Na, 0.35 mg Zn bulunmaktadır (Akan ve ark. 2021). Pancar yapraklarının roka ve su teresine benzer şekilde yüksek bir Cu konsantrasyonuna (13.42 mg/kg) sahip olduğu bulunmuştur. Pancarın yüksek bakır içeriği vücudun demir emilimine yardımcı olur, bu nedenle ateş ve kabızlığı tedavi etmek için kullanılır (Bangar ve ark. 2022).

4. Antioksidan Özellikleri

Bitkiler genellikle antioksidan özelliklere sahip birçok bileşen içerir. Antioksidanlar, vücutta serbest radikallerle savaşarak oksidatif stresi azaltabilen bileşenlerdir (Mohammed ve ark. 2018; Dogan ve Emsen 2018; Jamshidi-Kia ve ark. 2020; Doğan 2020; Göldağ ve ark. 2022; Shinde ve Pawar 2023; Erkokmaz ve ark. 2023; Tokgoz ve ark. 2023). Kırmızı pancar, antioksidan özelliği açısından en güçlü on sebze arasında yer alır. Sadece mineraller, besinler ve vitaminler açısından zengin olmakla kalmayıp aynı zamanda çeşitli tıbbi özelliklere sahip benzersiz fitobileşenlere sahip olduğu için mükemmel bir besin takviyesidir (Masih ve ark. 2019). Avrupa'da genellikle gıda olarak tüketilen doğal gıda boyası ve tıbbi bitki olarak kullanılan kırmızı pancar, antioksidan bileşiklerin harika bir kaynağıdır ve suda çözünür nitrojen içeren nitrat bakımından zengin bir bitkidir (Shaban ve ark. 2021).

Pancar rengini, topluca betalainler adıyla bilinen mor ve sarı pigmentlerinden almaktadır. Kırmızı pancarda bulunan tek antioksidan bileşikler betalainler değildir. Pancar, mükemmel antioksidanlar olarak da bilinen rutin, epikateşin ve kafeik asit gibi yüksek oranda biyoaktif fenolikler içerir (Masih ve ark. 2019). Kırmızı pancarın toplam fenolik

madde içeriğinin araştırıldığı bir çalışmada özellikle kırmızı pancar özütünde ve kabuğunda farklı sebzelerle kıyaslandığında fazla oranda fenolik madde olduğuna rastlanılmıştır (Okumuş 2016). Kırmızı pancar fenolik asitler ve flavonoidler fenolik bileşiklerin en iyi kaynaklarından biridir. Bu bileşikler, bitki büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan bitkiye patojenlere ve avcılara karşı koruma sağlayan ve antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuar, antiaterjenik, antitrombotik, antiaterojenik, kardiyoprotektif ve vazodilatör özelliklerle ilişkili ikincil metabolitlerdir (Kumar ve Brooks 2018).

Betalainler, iyi bir polifenoller, mineraller ve vitaminler kaynağıdır (Shaban ve ark. 2021). Betalain potansiyel bir nutrasötik olarak kabul edilir. Betalain'in yüksek antioksidan aktivitesi, olağanüstü elektron bağışlama kapasitesinden ve hücre zarlarını hedef alan oldukça reaktif radikalleri etkisiz hale getirme yeteneğinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir (Masih ve ark. 2019). Betalainler, yüksek antioksidan içeriğine sahip olan dondurma, şarap, reçel, marmelat ve yoğurt gibi farklı besinleri renklendirmek amacıyla kullanılmaktadır (Akan ve ark. 2021). Betalain, anti-kanser, antimikrobiyal, anti-lipidemik ve antioksidan gibi farmakolojik aktiviteleri nedeniyle insan sağlığında hayati bir rol oynamaktadır (Naseer ve ark. 2019).

Yoğurda pancar ekstratı ilave edilerek yapılan bir çalışmada farklı taşıyıcı ajanlarla kapsüllenmiş yoğurdun fizikokimyasal özellikleri, rengi, betalain, polifenol içeriği ve antioksidan kapasitesi üzerindeki etkisi incelenmesi sonucunda yoğurdun fonksiyonel özelliklerini artırmak için yoğurda pancar ekstraktlarının eklenmesiyle antioksidan aktivitesi önemli ölçüde artırılmıştır. Burada betalainler ve diğer polifenoller, söz konusu biyoaktiviteden sorumlu ana bileşiklerdir (Flores-Mancha ve ark. 2021). Kırmızı pancar ayrıca yüksek konsantrasyonlarda ikincil metabolitlere (fenolik asitler, flavonoidler, askorbik asit) sahiptir (El-Beltagi ve ark. 2018). Bu bileşiklerin güçlü antioksidan özellikleri, metal bağlama ve serbest radikal tutma özellikleri vardır (Babagil ve ark. 2018).

Kırmızı pancar suyundaki karotenoidlerin, vitaminlerin ve özellikle C vitamininin bileşiklerinin antioksidan aktiviteleri vardır bu nedenle kırmızı pancar oksidatif strese karşı hücrel bileşenler için koruyucu bir role sahiptir ve çeşitli hastalıklar için klinik sonuçları iyileştirebilir (Shaban ve ark. 2021). Bunlar arasında koroner kalp hastalıkları riski, kan basıncını düşürmek ve iltihabı azaltmak olarak sıralanabilir. Pancar suyunun bu özellikleri sebebiyle sporcular tarafından kullanım popülaritesini artmıştır (Eroğlu 2020). Pancar tozunun yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile incelendiği bir çalışmada pancar tozunun zengin ham lif kaynağı, toplam fenolikler, flavonoid bileşikleri ve antioksidan aktivite içerdiği gözlemlenmiştir (Alshehry 2019). Son araştırmalar, pancar kökü alımının yararlı fizyolojik etkiler gösterdiğini ve hipertansiyon, ateroskleroz gibi çeşitli patolojileri iyileştirdiğini kanıtlamıştır ve gıdalardaki antioksidan bileşiklerin sağlığı koruyucu bir faktör olarak önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Shaban ve ark. 2021; El-Beltagi ve ark. 2018).

5. Bazı Sağlık Faydaları

5.1. Hipertansiyon üzerine etkisi

Kırmızı pancar takviyesi kan basıncını düşürmek için kolay, erişilebilir, güvenli ve kanıta dayalı bir strateji olabilir. Pancar suyu uygulamasından sonra kan basıncındaki potansiyel azalma, serebrovasküler hastalıklar için ölüm oranındaki azalmaya katkıda bulunmaktadır. Yapılan çalışma sonucunda pancar suyu takviyesi hem sağlıklı hem de kardiyovasküler riski olanlarda sistolik kan basıncı ve diyastolik kan basıncı değerlerini düşürme konusunda büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (Bonilla Ocampo ve ark. 2018). Pancar suyu nitrat açısından zengindir ve kan basıncını düşürme potansiyeline sahiptir. Nitrat nitrik oksit üretimi için bir öncüdür ve kan dolaşımındaki konsantrasyonlarını artırarak endotel fonksiyonunu optimize eder (Benjamim ve ark. 2022). Son yapılan araştırmalar, hipertansiyonu durdurmak için diyet yaklaşımı gibi diyet modellerinin yararlı yüksek tansiyon düşürücü etkilerini, inorganik nitrat alımının artmasına bağlamaktadır. Başka bir çalışmada ise 16 denemenin yakın tarihli bir meta-analizi sonucu, inorganik nitrat ve pancar suyu takviyesinin sistolik de önemli bir azalma ile ilişkili olduğunu, oysa diyastolik yüksek tansiyon için anlamlı bir etki gözlenmediğini göstermiştir (Jajja ve ark. 2014). Bununla birlikte, bu tür beslenme yaklaşımları önerilmeden önce, inorganik nitratın uzun vadeli etkinliğinin, müdahalelerin toleransı, güvenliği, uyumluluğu ve maliyet etkinliğinin değerlendirilmesiyle birlikte daha yüksek kardiyovasküler risk altındaki kişilerde test edilmesi gerekir (Siervo ve ark. 2013).

5.2. Diyabet üzerine etkisi

Kırmızı pancar tüketimi, bir dizi sağlık yararı ile ilişkilendirilmiştir. Yakın zamanda yapılan bir çalışma, neobetaninden zengin pancar suyu tüketimini takiben, yemek sonrası glikoz ve insülin tepkisinde orta derecede bir azalma olduğunu göstermiştir. Hem glikoz hem de insülinin azaltılmasının, tip 2 diyabet riskini azaltma açısından yararlı olduğu düşünülmektedir (Chang ve ark. 2018). Yapılan bir çalışmada ise nitrat redüktaz aktivitesinin inhibisyonunun sadece glikoz ile birleştirilmiş pancar suyuna yönelik metabolik tepki isteğini azaltmakla kalmayıp, aynı zamanda obez bireylerde insülin direncini ve gizli insülin duyarlılığını desteklediği de ortaya çıkmıştır (Beals ve ark. 2017). Kırmızı pancarın glukoz düşürücü etkisinden sorumlu tek bileşen betalainler değildir. Buna ek olarak flavonoidler, apigenin, luteolin, kuersetin, kaempferitrin ve epikateşin de aktif bileşenler de katılır. Ayrıca protein glikasyonunda, glikatif ürünlerde azalma, insülin üreten hücrelerin yeniden canlanması, hiperglisemiye bağlı kardiyojenik fibrozis ile mücadele, insülin üreten hücrelerin hem sayı hem de salgılanma hacminde artış, inhibisyon dahil olmak üzere birçok etkisi vardır (Hadipour ve ark. 2020).

5.3. Antimikrobiyal aktivitesi

Pancarın antimikrobiyal potansiyeli, çeşitli bulaşıcı hastalıkları tedavi etmek için bir bitki olarak kullanılması sayesinde belirlenebilir. Antimikrobiyal potansiyel

açısından, gram-pozitif bakterilerin kırmızı pancarlara gram-negatiflere göre daha duyarlı olduğu bulunmuştur (Kumar ve Brooks 2018). Gram-pozitif bakterilerin pancar ekstraktlarının antibakteriyel etkisine karşı daha duyarlı iken gram negatif bakterilerin pancar ekstraktlarının antimikrobiyal etkisine karşı dirençli olduğu kaydedilmiştir (Spórna-Kucab ve ark. 2023). Pancar ekstraktları ve kırmızı pancardan elde edilen fitokimyasallar, renklendirici özellikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, özellikle insan sağlığını ve güzelliğini hedefleyen gıda ile ilgili uygulamalarda ve tüketici ürünlerinde antimikrobiyal özelliklerinden yararlanma konusunda çok fazla potansiyel vardır. Örneğin, kırmızı pancar bileşikleri, antimikrobiyal gıda ambalajları ve kozmetik ürünler gibi birçok ürüne ve ayrıca hastalığa karşı tedavi için aktif ilaç formülasyonlarına dahil edilmektedir (Kumar ve Brooks 2018). Pancardaki polifenolik bileşiklerin ekstraksiyon verimliliği mikrobiyal inhibitör aktivite ile ilişkilidir. Çünkü belirli ekstraktlar mikroorganizmaların ve metabolitlerinin gelişimini inhibe edebilen veya teşvik edebilen bu tür bileşiklerden oluşur. Pancar metanol ve etanol ekstraktlarında farklı antioksidan bileşikleri vardır. Metanol ekstraktlarının 1-dodekanamin, n,n-dimetil açısından zengin olduğu bulunurken, etanol ekstraktlarının daha yüksek konsantrasyonlarda oksiran, heksadekanoik asit ve n-hekzadekanoik asittir bulunur (Bangar ve ark. 2022).

5.4. Kansere üzerine etkisi

Önemli antioksidan ve anti-inflamatuar aktivitenin yanı sıra, kırmızı pancar fitokimyasalları hem iç hem de dış apoptotik yolların indüklenmesi yoluyla meme, karaciğer, kolon ve mesane kanseri hücre dizilerinde anti-proliferatif bir etki sağlar. Betanin ise kanser hücre hatlarına karşı *in vitro* anti-proliferatif etkiler gösterir (Babarykin ve ark. 2019). Pancarın kanser oluşumunu ve gelişimini engellemesinin ana yolları; hücre çoğalmasını engellemesi, apoptozu teşvik etmesi ve otofaji olduğu görülmüştür (Chen ve ark. 2021). Betaninler ayrıca bilinmeyen bir mekanizma ile inflamatuvar lezyonlara sızan nötrofillerin sayısını ve tümörlerde yeni kan damarı oluşumunu azaltır. Bu gözlemler, betaninlerin inhibe edici mekanizmalarından birinin, inflamatuvar lezyonlarda stromal elementlerin gelişimini engellemek olduğunu göstermektedir. Betaninler mutajenik değildir ve transforme hücrelerin moleküler mekanizmalarını, öncelikle büyüme hızlarını azaltarak ve apoptozu indükleyerek etkiler. Böylece, betaninlerin hem tümör ortamını hem de tümör hücresinin kendisini etkilediği sonucuna varılabilir (Lechner ve Stoner 2019). Betalainler için önerilen ilk antitümör mekanizması; tümör hücreleri ile çevre dokular arasındaki metabolit alışverişini ve tümör hücrelerinin infiltrasyon kapasitesini engelleyecek şekilde kesintiye uğratmasıdır (Ninfali ve Angelino 2013). Bir antikanser ilacı (doksorubisin) ve kırmızı pancar özü karışımı ile tedavi sonucunda meme ve prostat kanseri hücre dizilerinde sinerjistik bir antiproliferatif etki gösterdiği gözlemlenmiştir (Nikan ve Manayi 2019).

5.6. Böbrek fonksiyonu üzerine etkisi

Pancar suyunun pozitif hipertansif ve hiperglisemik etkisine rağmen, sınırlı sayıda çalışma böbrek koruyucu özelliklerin belirli böbrek parametreleri ile ilişkisini kabul etmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda da kırmızı pancarın iyileştirici etkisini doğrulamıştır. Böbreğin fonksiyonel parametreleri üzerinde faydalı bir ek tedavi olarak hipertansif kronik böbrek hasarı ve diyabetik nefropati hastaları dahil olmak üzere yüksek risk gruplarında mortaliteyi azalttığı görülmüştür (Mirmiran ve ark. 2020). Kreatinin ve üre, böbrek hasarı olan hastalarda böbrek fonksiyonunun temel belirteçleridir. Kreatinin ve üre, esas olarak vücuttan idrarla atılan metabolik atık ürünlerdir. Bu nedenle, klorpirifose maruz kalmanın ardından bu belirteçlerin artan seviyeleri renal disfonksiyonu yansıtır. Serumda artmış kreatinin, azalmış glomerüler filtrasyon hızını yansıtırken, yüksek üre, disfonksiyonel yeniden emilimi gösterir. Kırmızı pancar ekstraktının ile ön tedavi, serum kreatinin ve üre seviyelerinde klorpirifosenin neden olduğu artışları önemli ölçüde azaltmıştır. Bu durum, kırmızı pancar ekstraktının membran bütünlüğünü koruduğunu ve biyobelirteçlerin kana sızmasını sınırlayarak böbrek koruyucu etkilere neden olduğunu göstermiştir (Albasher ve ark. 2019). Kırmızı pancar bazlı içeceklerin gentamisin kaynaklı böbrek stresini iyileştirmek için nefroprotektif etkileri değerlendirilmiştir. Özellikle böbrek dokularındaki ve serum proteinlerindeki antioksidan enzimler önemli ölçüde iyileşirken, nefrotoksisite ile indüklenen sıçanlarda lipid peroksidasyonu, nitrik oksit, üre ve kreatinin seviyeleri önemli ölçüde azalmıştır. Ayrıca, histolojik değerlendirme, pancar içecekleri ile tedavi edilen sıçanlarda daha iyi böbrek portföyü olduğunu göstermiştir (Butt ve ark. 2019).

5.7. Anti-inflamatuar etkisi

B. vulgaris anti-inflamatuar etkileri, süperoksit anyonunun ve proinflamatuar sitokinlerin üretimini inhibisyonuna bağlı olan ve artan sitokin salınımını içeren bir mekanizma tarafından yürütülür (Martinez ve ark. 2015). Betalainlerin sitokinlerle güçlendirilmesi ile endotelial hücrelerde hücreler arası hücre adezyon molekülü etkili bir biçimde zorladığı gösterilmiştir. Üstelik betalainler, lipoksijenaz ve siklooksijenaz enzimlerini engelleme kabiliyetini de göstermiştir. Bu doğrultuda araştırmaların etkisi, betalainlerin değişik serin ve tirozin kalıntıları ya da substrat bağlayıcı amino asitler ile birbirlerini etkilemeleriyle ortaya çıktığını gösterilmiştir (Milton-Laskibar ve ark. 2021). Pancar suyu, mitojen fitohemaglutinin ve konkanavalin A ile uyarılmış kültürlerde, triptofan bozulmasını ve neopterin üretimini inhibe etmiştir. Ayrıca hücreler daha yüksek konsantrasyonlarda meyve suyu ile muamele edildiğinde daha düşük bir neopterin konsantrasyonu elde edilmiştir. Pancar suyunun, mitojenle uyarılan periferik kan mononükleer hücrelerinde triptofan ve neopterin üretimini bozulmasına neden olan interferon- γ 'nın oluşumu ve salınması üzerinde baskılayıcı bir etkisi olduğunu göstermektedir. *B. vulgaris*'in antioksidan bileşikleri triptofan degradasyonunun inhibisyonundan sorumlu

olabilmektedir. Çünkü reaktif oksijen türlerini detoksifiye ederek ve reaktif oksijen türleri oluşumunda bir azaltarak etki edebilirler (Moreno ve ark. 2021).

5.8. Kardiyovasküler hastalıklar üzerine etkisi

Kardiyovasküler hastalıkların gelişimi için majör bir risk faktörü artmış kan basıncı veya hipertansiyondur. Epidemiyolojik kanıtlar, meyve ve sebzeler açısından zengin bir diyetin kan basıncını ve ardından gelen kardiyovasküler hastalık riskini azalttığını göstermektedir (Jakubcik ve ark. 2021). Pancarın kardiyovasküler sağlık yararları, yüksek inorganik nitrat konsantrasyonuna bağlanır. Vücutta nitrat, vazodilatör ve endotelial fonksiyon koruyucu olarak işlev gören nitrit ve nitrik okside dönüştürülür. İnorganik nitrat takviyesinin, sonuçta endotel fonksiyonunda iyileşmeye yol açan kan basıncının düşmesiyle sonuçlanan periferik vasküler vazodilatasyona neden olduğu görülmüştür. Ayrıca kardiyovasküler durum üzerindeki etkisine ek olarak, inorganik nitrat müdahalesinin kan pıhtılaşması üzerinde de olumlu etkileri olduğu görülmektedir. Pancardan elde edilen inorganik nitrat ekstresi, trombosit agregasyonunu azaltarak ateroskleroz ve felci azalmıştır ve bunun sonucunda kalp krizi riski de azalmıştır (Bahrami ve ark. 2022). Yapılan bir çalışmada koroner arter hastalığı olan hastalarda betalain içeriğinden zengin besin özlery ile takviyenin aterosklerotik risk unsurları ile ilgili potansiyel etkileri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak homosistein, glikoz, toplam kolesterol, trigliserit ve düşük yoğunluklu lipoprotein konsantrasyonunu önemli oranda düşürdüğü görülmüştür. Üstelik, betalain içeriği açısından verimli takviyeler hem sistolik hem de diyastolik kan basıncını düşürmüştür (Rahimi ve ark. 2019).

5.9. Obezite üzerine etkisi

Obezite önemli sağlık sorunlarından biridir ve dünya genelinde milyonlarca insanın sağlığını etkileyen kronik bulaşıcı olmayan hastalıklarla doğrudan ilişkilidir (de Castro ve ark. 2019). Pancar, yüksek lif içeriği ve düşük yağ içeriği nedeniyle obezite için iyi bir bileşendir (Farida 2021). Yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar, kırmızı pancar yaprağı takviyesinin, LDL düzeyi yüksek olan dislipidemilerin tedavisinde destek olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca katımların vücut ağırlıklarında ve BKİ'lerinde önemli azalma olduğu görülmüştür (de Castro ve ark. 2019). Adiposit öncesi farklılaşmayı engelleme veya lipogenez sürecini kontrol etmenin obezite için etkili bir tedavi olduğu yaygın olarak bilinmektedir. Pancar ekstresi pankreatik lipaz inhibisyonu ile yağ asidinin girişini bloke edebilir ve aşırı trigliserit birikimini önleyebilir. Ayrıca preadiposit hücre ve yağ globüllerini inhibe ederek antiobezite ve zayıflama ile sonuçlanabilir (Song 2021).

5.10. İskelet kası üzerine etkisi

Nitrik oksit önemli bir sinyal molekülüdür. Kan akışı tarafından gözden geçirildiğinde, iskelet kası uyarım-kasılması eşleşmesi ve mitokondriyal biyoenerjetikler dahil olmak üzere birçok biyolojik sürecin düzenlenmesinde yer

almaktadır. Ayrıca kırmızı pancar suyu tüketiminin kas kasılması sırasında ATP dönüşümünü azalttığı ve bunun egzersiz sırasında oksijen tüketiminde gözlemlenen zayıflamaya katkıda bulunduğu ifade edilmiştir (Whitfield ve ark. 2016). Pancar suyu alımı, iskelet kas gücünü veya maksimum güç çıkışına ulaşmak için gereken süreyi artırmaktadır. Böylece, pancar suyu spor performansını çeşitli mekanizmalarla geliştirebilir. Bunlar, iskelet kasında oksijen tüketiminde bir azalma, kas bozulmasını azaltabilen ve yorgunluğun başlamasını geciktirebilen anaerobik ve aerobik solunum arasındaki geçişte hızlanma ve ayrıca artan güç çıkışı ve kuvveti içerir (Zamani ve ark. 2021).

6. Sonuç

Kırmızı pancar genellikle gıda amaçlı kullanılmasının yanında ilaç, boya gibi farklı alanlarda da yararlanılmaktadır. Kırmızı pancarın yapısında bulunan bileşikler sayesinde biyoyararlılığı da yüksektir. Biyoyararlılığın yüksek olması vücuda alınan besinlerin kolay bir şekilde emilip vücut için yararlı etki göstermesini sağlamaktadır. Kırmızı pancar içerdiği betalainler, fenolik bileşikler ve karotenoidler sebebiyle antioksidan ve anti-inflamatuar etkilere sahiptir. Bu etkiler sayesinde pancar çeşitli hastalıkların rol oynamaktadır. Aynı zamanda içeriğinde bulunan inorganik nitrat da hastalıkların iyileştirilmesinde ve önlenmesinde etkilidir. Vitamin ve mineral içeriği sayesinde vücutta gerçekleşen çeşitli mekanizmalara yardımcı olurlar. Tüm aktif maddeler ve aktiviteleri klinik deneylerle doğrulanmamış ve ilgili mekanizmalar da tam olarak aydınlatılmamıştır ancak ucuz ve düşük toksik doğal fonksiyonel gıda olarak uygulama potansiyeli de küçümsenmemelidir. Kırmızı pancarın hastalıklar üzerindeki etkisini ve antioksidan aktivitesini tespit etmek için daha fazla deney ve çalışmaya ihtiyaç vardır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

Kaynaklar

Abotaleb M, Liskova A, Kubatka P, Büsselberg D. 2020. Therapeutic potential of plant phenolic acids in the treatment of cancer. *Biomolecules*. 10:221

Akan S, Horzum Ö, Güneş NT. 2019. Fonksiyonel Gıda Kaynağı 'Kırmızı Pancar'. *Proceedings Book of 5th International Eurasian Congress on Natural Nutrition, Healthy Life & Sport*, 1537-1550

Akan S, Tuna Güneş N, Erkan M. 2021. Red beetroot: Health benefits, production techniques, and quality maintaining for food industry. *J Food Process Preserv*. 45(10):e15781.

Albasher G, Almeer R, Alarifi S, Alkhtani S, Farhood M, Al-Otibi FO, Rizwana H. 2019. Nephroprotective role of *Beta vulgaris* L. root extract against chlorpyrifos-induced renal injury in rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019: 3595761.

Albuquerque BR, Heleno SA, Oliveira MBP, Barros L, Ferreira IC. 2021. Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. *Food Funct*. 12:14-29

Al-Harbi LN, Pandurangan SB, Al-Dossari AM, Shamlan G, Salamatullah AM, Alshatwi AA, Alotiby A A. 2021. *Beta vulgaris rubra* L. (Beetroot) peel methanol extract reduces

oxidative stress and stimulates cell proliferation via increasing VEGF expression in H₂O₂ induced oxidative stressed human umbilical vein endothelial cells. *Genes*. 12(9):1380

Alshehry GA. 2019. Utilization of beetroot as a natural antioxidant, pigment and antimicrobial in cupcake during the storage period. *Int J Eng Res Technol*. 8:652-659

Aydın R, Akça F, Aras D, Baydan M. Kırmızı pancar suyu yoluyla nitrat tüketiminin fizyolojik performans ve sağlık üzerine etkileri. *Spor metre Beden Eğitimi ve Spor Bilimleri Dergisi*, 17:14-27

Aykın-Dinçer E, Güngör KK, Çağlar E, Erbaş M. 2020. The use of beetroot extract and extract powder in sausages as natural food colorant. *Int J Food Eng*. 17(1):75-82.

Aznury M, Farhan I, Agustina L. 2020. Characterization of Red Beetroot Soft Jelly Candy with Guava Extract and Gel Colloid Added. In *Journal of Physics: Conference Series*, 1500(1), p. 012053, IOP Publishing.

Babagil A, Tasgin E, Nadaroglu H, Kaymak HC. 2018. Antioxidant and antiradical activity of beetroot (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva* Alef.) grown using different fertilizers. *J Chem*. 2018:7101605

Babarykin D, Smirnova G, Pundinsh I, Vasiljeva S, Krumina G, Agejchenko V. 2019. Red beet (*Beta vulgaris*) impact on human health. *J Biosci Med* 7:61-79

Bahrami LS, Arabi SM, Fezy Z, Rezvani R. 2021. The effect of beetroot inorganic nitrate supplementation on cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-regression of randomized controlled trials. *Nitric Oxide*. 115:8-22

Bangar SP, Sharma N, Sanwal N, Lorenzo JM, Sahu JK. 2022. Bioactive potential of beetroot (*Beta vulgaris*). *Food Res Int*. 158:111556

Beals JW, Binns SE, Davis JL, Giordano GR, Klochak AL, Paris HL, Bell C. 2017. Concurrent beet juice and carbohydrate ingestion: influence on glucose tolerance in obese and nonobese adults. *J Nutr Metab*. 2017:6436783

Benjamim CJR, Porto AA, Valenti VE, Sobrinho ACDS, Garner DM, Gualano B, Bueno Junior CR. 2022. Nitrate derived from beetroot juice lowers blood pressure in patients with arterial hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Front Nutr*. 9:823039

Bonilla Ocampo DA, Paipilla AF, Marín E, Vargas-Molina S, Petro JL, Pérez-Idárraga A. 2018. Dietary nitrate from beetroot juice for hypertension: a systematic review. *Biomolecules*. 8:134

Butt MS, Randhawa MA, Shahid M. 2019. Nephroprotective effects of red beetroot-based beverages against gentamicin-induced renal stress. *J Food Biochem*. 43(7):e12873

Capper TE, Houghton D, Stewart CJ, Blain AP, McMahon N, Siervo M, Stevenson EJ. 2020. Whole beetroot consumption reduces systolic blood pressure and modulates diversity and composition of the gut microbiota in older participants. *NFS Journal*. 21:28-37

Carlström M, Lundberg JO, Weitzberg E. 2018. Mechanisms underlying blood pressure reduction by dietary inorganic nitrate. *Acta Physiol*. 224(1):e13080

Ceclu L, Nistor OV. 2020. Red beetroot: Composition and health effects-A review. *J Nutr Med Diet Care*. 6:043

Chang P, Hafiz M, Boesch C. 2018. Beetroot juice attenuates glycaemic response in healthy volunteers. *Proc Nutr Soc*. 77(OCE4): E165

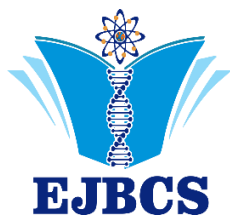
Chen L, Zhu Y, Hu Z, Wu S, Jin C. 2021. Beetroot as a functional food with huge health benefits: Antioxidant, antitumor, physical function, and chronic metabolomics activity. *Food Sci Nutr*. 9:6406-6420

Czyzowska A, Siemianowska K, Sniadowska M, Nowak A. 2020. Bioactive compounds and microbial quality of stored

- fermented red beetroots and red beetroot juice. Polish J Food Nutr Sci. 70:35-44
- da Silva, D. V. T., dos Santos Baião, D., de Oliveira Silva, F., Alves, G., Perrone, D., Del Aguila, E. M., & Paschoalin, V. M. F. (2019). Betanin, a natural food additive: Stability, bioavailability, antioxidant and preservative ability assessments. *Molecules*, 24(3):458
- de Castro APRB, da Cunha DT, Antunes AEC, Corona LP, Bezerra RMN. 2019. Effect of freeze-dried red beet (*Beta vulgaris* L.) leaf supplementation on biochemical and anthropometrical parameters in overweight and obese individuals: A pilot study. *Plant Foods Hum Nutr*. 74:232-234
- Dogan M, Emsen B. 2018. Anti-cytotoxic-genotoxic influences of in vitro propagated *Bacopa monnieri* L. Pennell in cultured human lymphocytes. *Eurasian J Bio Chem Sci* 1(2):48-53
- Doğan M. 2020. Su teresinin (*Nasturtium officinale* R. BR.) beslenme-diyet potansiyeli ve antioksidan özellikleri: bir derleme. *International Anatolia Academic Online Journal Health Sciences, Int Anatol Acad Online J (Health Sciences)*. 6(3):222-233
- Domínguez R, Maté-Muñoz JL, Cuenca E, García-Fernández P, Mata-Ordoñez F, Lozano-Estevan MC, Garnacho-Castaño MV. 2018. Effects of beetroot juice supplementation on intermittent high-intensity exercise efforts. *J Int Soc Sports Nutr*. 15(1):2
- Düker GO. 2017. *Beta vulgaris* L.(kırmızı pancar) ve turşularında PH değişimleri, antioksidan ve sitotoksik aktiviteleri ile fenolik bileşenlerinin incelenmesi, Anadolu University, Turkey.
- El-Beltagi HS, El-Mogy MM, Parmar A, Mansour AT, Shalaby TA, Ali MR. 2022. Phytochemical characterization and utilization of dried red beetroot (*Beta vulgaris*) peel extract in maintaining the quality of Nile Tilapia Fish Fillet. *Antioxidants*. 11(5):906
- El-Beltagi HS, Mohamed HI, Megahed BM, Gamal M, Safwat G. 2018. Evaluation of some chemical constituents, antioxidant, antibacterial and anticancer activities of *Beta vulgaris* L. root. *Fresenius Environ Bull*. 27: 6369-6378
- Erkorkmaz F, Altunbay M, Demirci Z, Doğan M. 2023. Chia tohumunun (*Salvia hispanica* L.) bileşimi, besinsel değeri ve sağlık faydaları. *Scientific and Academic Research*. 2(1):96-106
- Eroğlu MN. 2020. Farklı dozlarda alınan pancar suyunun submaksimal koşu performansına etkisi, Bursa Uludağ Üniversitesi, Eğitim Bilimleri Enstitüsü, Bursa, Turkey.
- Faggio C, Sureda A, Morabito S, Sanches-Silva A, Mocan A, Nabavi SF, Nabavi SM. 2017. Flavonoids and platelet aggregation: a brief review. *Eur J Pharmacol*. 807:91-101
- Farida F, Santoso AH, Rahman N. 2022. Modification of snack bar cheubit with addition of seaweed (*Eucheuma Cottonii*) and beet (*Beta vulgaris* L.) as a snack alternative for elementary school children obesity. *Journal of Local Therapy*. 1:24-29
- Flores-Mancha MA, Ruiz-Gutiérrez MG, Sánchez-Vega R, Santellano-Estrada E, Chávez-Martínez A. 2021. Effect of encapsulated beet extracts (*Beta vulgaris*) added to yogurt on the physicochemical characteristics and antioxidant activity. *Molecules*. 26(16):4768
- Fu Y, Shi J, Xie SY, Zhang TY, Soladoye OP, Aluko RE. 2020. Red beetroot betalains: Perspectives on extraction, processing, and potential health benefits. *J Agric Food Chem*. 68:11595-11611
- Göldağ R, Göldağ ÖG, Doğan M. 2022). Beslenme ve sağlık için kara mürver'in (*Sambucus nigra* L.) önemi: biyolojik aktiviteleri. *AP Journal of Halal Lifestyle*. 4(1):10-17
- Grgić J, Šelo G, Planinić M, Tišma M, Bucić-Kojić A. 2020. Role of the encapsulation in bioavailability of phenolic compounds. *Antioxidants*. 9(10):923
- Gül H, Hayıt F, Özer B, Acun S. 2021. Kırmızı pancar ununun glutensiz bisküvi üretiminde kullanılması. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*. 9:1166-1173
- Hadipour E, Taleghani A, Tayarani-Najaran N, Tayarani-Najaran Z. 2020. Biological effects of red beetroot and betalains: A review. *Phytother Res*. 34:1847-1867
- Jajja A, Sutyarjoko A, Lara J, Rennie K, Brandt K, Qadir O, Siervo M. 2014. Beetroot supplementation lowers daily systolic blood pressure in older, overweight subjects. *Nutr Res*. 34:868-875
- Jakubcik EM, Rutherford-Markwick K, Chabert M, Wong M, Ali A. 2021. Pharmacokinetics of nitrate and nitrite following beetroot juice drink consumption. *Nutrients*. 13:281
- Jamshidi-Kia F, Wibowo JP, Elachouri M, Masumi R, Salehifard-Jouneghani A, Abolhassanzadeh Z, Lorigooini Z. 2020. Battle between plants as antioxidants with free radicals in human body. *J HerbMed Pharmacol*. 9(3):191-199
- Kasım R, Kasım MU. 2019. Renkli meyve ve sebzelerin bileşimi ve insan sağlığı açısından önemi. 8 th International Vocational Schools Symposium, Cilt 3:31
- Kathiravan T, Nadasabapathi S, Kumar R. 2014. Standardization of process condition in batch thermal pasteurization and its effect on antioxidant, pigment and microbial inactivation of Ready to Drink (RTD) beetroot (*Beta vulgaris* L.) juice. *Int Food Res J*. 21(4): 1305-1312
- Kaurinovic B, Vastag D. 2019. Flavonoids and phenolic acids as potential natural antioxidants. London, UK: IntechOpen, pp:1-20
- Kaya G, Baysal T. 2016. Production of fermented red beet juice powder by using spray and drum drier. *Gıda*, 41:305-310
- Kiokias S, Proestos C, Oreopoulou V. 2020. Phenolic acids of plant origin-A review on their antioxidant activity in vitro (o/w emulsion systems) along with their *in vivo* health biochemical properties. *Foods*. 9:534
- Kolaç T, Gürbüz P, Yetiş G. 2017. Doğal ürünlerin fenolik içeriği ve antioksidan özellikleri. İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi. 5:26-42
- Kumar N, Goel N. 2019. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol Rep*. 24:e00370
- Kumar S, Brooks MSL. 2018. Use of red beet (*Beta vulgaris* L.) for antimicrobial applications-a critical review. *Food Bioproc Tech*. 11:17-42
- Lechner JF, Stoner GD. 2019. Red beetroot and betalains as cancer chemopreventative agents. *Molecules*. 24:1602
- Lembong E, Utama GL, Saputra RA. 2019. Phytochemical test, vitamin C content and antioxidant activities beet root (*Beta vulgaris* Linn.) extracts as food coloring agent from some areas in Java Island. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, 360:1-7
- Liu C, Hu B, Cheng Y, Guo Y, Yao W, Qian H. 2021. Carotenoids from fungi and microalgae: A review on their recent production, extraction, and developments. *Bioresour Technol*. 337:125398
- Lorizola IM, Miyamoto JÉ, Vieira ALF, Sumere BR, Bezerra RMN, Torsoni MA, Capitani CD. 2021. Beet (*Beta vulgaris* L.) stalk and leaf supplementation changes the glucose homeostasis and inflammatory markers in the liver of mice exposed to a high-fat diet. *Food Chemistry: Molecular Sciences*. 2:100018
- Maoka T. 2020. Carotenoids as natural functional pigments. *J Nat Med*. 74:1-16
- Maqbool H, Safeena MP, Abubacker Z, Azhar M, Kumar S. 2021. Effect of beetroot peel dip treatment on the quality

- preservation of Deccan mahseer (Tor khudree) steaks during frozen storage (-18 C). *Lwt.* 151:112222
- Martinez RM, Longhi-Balbinot DT, Zarpelon AC, Staurengo-Ferrari L, Baracat MM, Georgetti SR, Casagrande R. 2015. Anti-inflammatory activity of betalain-rich dye of *Beta vulgaris*: effect on edema, leukocyte recruitment, superoxide anion and cytokine production. *Arch Pharm Res.* 38:494-504
- Masih D, Singh N, Singh A. 2019. Red beetroot: A source of natural colourant and antioxidants: A review. *J Pharmacogn Phytochem.* 8:162-166
- Mereddy R, Chan A, Fanning K, Nirmal N, Sultanbawa Y. 2017. Betalain rich functional extract with reduced salts and nitrate content from red beetroot (*Beta vulgaris* L.) using membrane separation technology. *Food Chem.* 215:311-31
- Milton Laskibar I, Martínez JA, Portillo MP. 2021. Current knowledge on beetroot bioactive compounds: Role of nitrate and betalains in health and disease. *Foods.* 10:1314
- Mirmiran P, Houshialsadat Z, Gaeini Z, Bahadoran Z, Azizi F. 2020. Functional properties of beetroot (*Beta vulgaris*) in management of cardio-metabolic diseases. *Nutr. Metab.* 17:1-15
- Mohammed FS, Akgul H, Sevindik M, Khaled BMT. 2018. Phenolic content and biological activities of *Rhus coriaria* var. *zebaria*. *Fresen Environ Bull.* 27(8):5694-5702
- Moreno Ley CM, Osorio-Revilla G, Hernández Martínez DM, Ramos-Monroy OA, Gallardo-Velázquez T. 2021. Anti-inflammatory activity of betalains: a comprehensive review. *Hum Nutr Metab.* 25:200126
- Mutha RE, Tatiya AU, Surana SJ. 2021. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: An overview. *Future J Pharm Sci.* 7:1-13
- Mzoughi Z, Chahdoura H, Chakroun Y, Cámara M, Fernández-Ruiz V, Morales P, Majdoub H. 2019. Wild edible Swiss chard leaves (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*): Nutritional, phytochemical composition and biological activities. *Food Res. Int.* 119:612-621
- Namazzadeh G, Ehsani A, Ghasempour Z. 2022. Microencapsulation of red beet extract using chitosan-Persian gum complex coacervates. *J Food Process Preserv.* 46(12):e17148
- Naseer S, Hussain S, Abid A. 2019. Betalain as a Food Colorant: its Sources, Chemistry and Health Benefits: Chemistry of Betalain and its Role as Food Colorant. *Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences: B. Life and Environmental Sciences.* 56:1-8
- Nikan M, Manayi A. 2019. *Beta vulgaris* L. In *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*. Academic Press, pp:153-158
- Ninfali P, Angelino D. 2013. Nutritional and functional potential of *Beta vulgaris cicla* and *rubra*. *Fitoterapia.* 89:188-199
- Novoveská L, Ross ME, Stanley MS, Pradelles R, Wasiolek V, Sassi JF. 2019. Microalgal carotenoids: A review of production, current markets, regulations, and future direction. *Marine Drugs.* 17:640
- Okumuş E. 2016. Doğal renklendirici siyah havuç ve kırmızı pancar suyu konsantresi kullanılarak sürülebilir peynir üretimi. *Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.*
- Pavlović NV, Mladenović J, Stevović V, Bošković-Rakočević L, Moravčević Đ, Poštić D, Zdravković J. 2021. Effect of processing on vitamin C content, total phenols and antioxidative activity of organically grown red beetroot (*Beta vulgaris* ssp. *rubra*). *Food and Feed Research.* 48:131-139
- Platosz N, Sawicki T, Wiczkowski W. 2020. Profile of phenolic acids and flavonoids of red beet and its fermentation products. Does long-term consumption of fermented beetroot juice affect phenolics profile in human blood plasma and urine?. *Polish J Food Nutr Sci.* 70:55-65
- Rahimi P, Mesbah-Namin SA, Ostadrahimi A, Abedimanesh S, Separham A, Jafarabadi MA. 2019. Effects of betalains on atherogenic risk factors in patients with atherosclerotic cardiovascular disease. *Food Funct.* 10:8286-8297
- Rashmi HB, Negi PS. 2020. Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. *Food Res Int.* 136:109298
- Rodriguez-Amaya DB. 2019. Update on natural food pigments-A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. *Food Res Int.* 124:200-205
- Sadowska Bartosz I, Bartosz G. 2021. Biological properties and applications of betalains. *Molecules.* 26: 2520
- Sauer L, Li B, Bernstein PS. 2019. Ocular carotenoid status in health and disease. *Annu Rev Nutr.* 39:95-120
- Sawicki T, Bączek N, Wiczkowski W. 2016. Betalain profile, content and antioxidant capacity of red beetroot dependent on the genotype and root part. *J Funct Foods.* 27:249-261
- Sevindik M, Akgul H, Pehlivan M, Selamoglu Z. 2017. Determination of therapeutic potential of *Mentha longifolia* ssp. *longifolia*. *Fresen Environ Bull.* 26(7):4757-4763
- Shaban NZ, Abd El-Kader SE, Mogahed FA, El-Kersh MA, Habashy NH. 2021. Synergistic protective effect of *Beta vulgaris* with meso-2, 3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced neurotoxicity in male rats. *Sci. Rep.* 11:252
- Shahidi F, Yeo J. 2018. Bioactivities of phenolics by focusing on suppression of chronic diseases: A review. *Int J Mol Sci.* 19:1573
- Shinde ST, Pawar VS. 2023. The antioxidant effect of certain fruit and vegetables: A review. *J Curr Res Food Sci.* 4(1):11-16
- Siervo M, Lara J, Ogbonmwan I, Mathers JC. 2013. Inorganic nitrate and beetroot juice supplementation reduces blood pressure in adults: a systematic review and meta-analysis. *J Nutr.* 143:818-826
- Song H. 2021. Anti-Obesity Effects of Red Beet Extract. *Int J Adv Smart Convergence.* 10:225-232
- Spiegel M, Gamian A, Sroka, Z. 2021. Antiradical activity of beetroot (*Beta vulgaris* L.) betalains. *Molecules.* 26:2439
- Spórna-Kucab A, Tekieli A, Grzegorzczak A, Świątek Ł, Boguszewska A, Skalicka-Woźniak K. 2023. Betaxanthin profiling in relation to the biological activities of red and yellow *Beta vulgaris* L. extracts. *Metabolites.* 13:408
- Sun T, Rao S, Zhou X, Li L. 2022. Plant carotenoids: Recent advances and future perspectives. *Mol Hortic.* 2: 3
- Székely D, Máté M. 2022. Red Beetroot (*Beta vulgaris* L.). In *Advances in Root Vegetables Research*. IntechOpen, 1-21
- Tokgoz A, Emsen B, Dogan M. 2023. Allelopathic effects of some lichens on growth and antioxidant activities of in vitro propagated *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. *J Taibah Univ Sci.* 17(1):2229595
- Tomar O, Akarca G, Çağlar A. 2020. Kırmızı Pancar Sirkesinin Fizikokimyasal, Mikrobiyolojik ve Duyusal Özellikleri. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi.* 26:1234-1238
- Vaitkevičienė N, Saprionaitė A, Kulaitienė J. 2022. Evaluation of proximate composition, mineral elements and bioactive compounds in skin and flesh of beetroot grown in Lithuania. *Agriculture.* 12:1833
- Whitfield J, Ludzki A, Heigenhauser GJF, Senden JM, Verdijk LB, van Loon LJ, Holloway GP. 2016. Beetroot juice supplementation reduces whole body oxygen consumption but does not improve indices of mitochondrial efficiency in human skeletal muscle. *J Physiol.* 594:421-435
- Wong TH, Sim A, Burns SF. 2021. The effect of beetroot ingestion on high-intensity interval training: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients.* 13:3674

- Yeler HB. 2021. Kırmızı pancar ve üzüm kabuğundan farklı ekstraksiyon koşullarında boyar madde üretimi. Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, Türkiye
- Yılmaz FM, Gençdağ E, Görgüç A, Birişik M, Genç E, Başkurt C. 2019. Kırmızı pancar suyu üretiminde enzim ön uygulaması: işlem koşullarının meyve suyu verimi, betanin miktarı, toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite üzerine etkisi. Gıda. 44:593-604.
- Zamani H, De Joode MEJR, Hossein IJ, Henckens NFT, Guggeis MA, Berends JE, van Breda SGJ. 2021. The benefits and risks of beetroot juice consumption: A systematic review. Crit Rev Food Sci. 61:788-804
- Zhang L, Li Y, Liang Y, Liang K, Zhang F, Xu T, Wang M, Song H, Liu X, Lu, B. 2019. Determination of phenolic acid profiles by HPLC-MS in vegetables commonly consumed in China. Food Chem. 276:538-546



Dropsy Syndrome (Tummy Cavity Oedema, Assist)

Nurdan Filik* 

*Suleyman Demirel University, Isparta, Turkey

*Corresponding author : nurdanfilik@sdu.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0003-4376-7298>

Received : 04/12/2023
Accepted : 12/01/2024

To Cite/Atf için: Filik N. 2024. Dropsy Syndrome (Tummy Cavity Oedema, Assist). Eurasian J Bio Chem Sci, 7(1):62-65. <https://doi.org/10.46239/ejbc.1400135>

Abstract: Dropsy Syndrome (Tummy Cavity Oedema, Assist) fish are having trouble swimming, breathe, and has a bulging tummy. Oedema occurs because the small blood vessels (capillaries) in your body leak fluid. Leaking fluid around the vein. It accumulates in tissues and causes swelling. There are literatures that consider dropsy as a disease, but there are also literatures that consider it only as a serious symptom. In this respect, it is an important disease case status and report worth investigating. Dropsy, also spelled oedema, edema, and also known as fluid retention, dropsy, oedema, hydropsy and swelling, is build-up of fluid in body tissue. Most commonly, tummy is affected. Symptoms may include skin which feels tight, area may feel heavy, and joint stiffness. In dropsy case, we observed dangerous level loose scales in the fish body. The aim of this review is to examine dropsy syndrome in fish. With dropsy syndrome that occur in visceral organs are internal septicemia, hyperplasia, telangiectasia, dermatitis, and granuloma nephritis. The conclusion of this research, that vital importance Dropsy Syndrome.

Keywords: Dropsy Syndrome, Tummy Cavity Oedema, Dropsy, Assist, Fish Ailment, Clinical case

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

Dropsy Syndrome (Tummy Cavity Oedema, Assist, Dropsy) is a critical finding that occurs in many diseases. At the same time, this oedema problem encountered even when there is no disease. Oedema is phenomenon of extravasation of blood fluid and increase in fluid between cells. Commonly this oedema form called 'anasarca'. The basic principle of phenomenon of oedema is the loss of balance between blood fluid and extracellular fluid Abdominal cavity intermembrane oedema (hydroperitoneum, assist, ascites) occurs (Emmett and Seldin, 1997; Scallan et al., 2010; Kumar et al., 2015; Goljan, 2019; Freire et al., 2023). Bad water conditions can trigger dropsy symptom in fish (Freire et al., 2023). Fluid entering body begins to accumulate in visceral organs and physical appearance created by this accumulation is called "dropsy".

It is thought to be one of the underlying causes of dropsy. Polycystic Kidney Disease (PKD) is a condition where fluid filled cysts form on the kidney which leads to overall renal failure. Zebrafish has been recently adapted to study PKD, because of its powerful embryology and genetics. However, there are concerns on conservation of this lower vertebrate in modeling PKD (Koslow et al., 2023).

In some cases of dropsy, constipation is also observed. With overfeeding, digestive system swells and cannot digest, this system becomes blocked. This situation does not develop suddenly or quickly, but takes shape over time. Feeds are either given in excess or feeding must be done at very frequent intervals. Feces that hang from fish anus and remains suspended for long time. There is also a color change in this stool. In treatment and prevention; 30 minutes in paraffin wax. Marinated shrimp meal and boiled spinach are mixed with a small amount of live food and given orally. The fish is treated in a separate environment and it is monitored whether it takes food or not (Stokoe, 1966).

2. Dropsy Syndrome (Tummy Cavity Oedema)

Generally, most diseases cause excessive abnormal accumulation of fluid in the peritoneal cavity, amounting to almost half of the body weight. While neoplasia and chronic organ failure are seen in older fish, blistering in young fish is usually caused by acute infectious disease. Any disease or condition that disrupts osmoregulation potentially creates acid in the skin, independent of edema formation. Aspirating a few cc of fluid will shed light on the underlying causes, but aspirating the entire fluid surgically will be more revealing. Care should be taken when aspirating fluid. Excessive fluid may accumulate in the ovaries, resulting in

ovarian neoplasia. Additionally, at the point when the fish is removed from the water, edema fluid will flow passively from the genital pores (Wildgoose, 2007).

Contrary to popular belief, a dropsy problem is not a disease. Dropsy is actually used to describe a condition in which external symptoms occur, rather than disease. Tummy of body due to water intake may be because of infection ailment or organ failure. This unchecked water increase also must be needs to come out of body, if this water does not come out, body of fish begins to absorb water and result can be fatal. Kidneys are responsible for excreting water (Sen and Mandal, 2018). Also, dropsy is a syndrome. And this syndrome should not be confused with Bloat Disease.

3. Dropsy symptoms

Symptom of excessive is water retention in the body. Abdomen more swollen in contrast to its normal roundness. According to clinical symptoms, look weak and swim on surface, difficulty in breathing, and swollen stomach, decreased appetite, bruises on fins and tail, kidney has hemorrhage purpura widely (Rahmaningsih, 2012).

Depending on the underlying cause of kidney and gill malfunction, you may see a variety of physical symptoms. Dropsy isolated condition, is associated with various forms of swelling. Symptoms are oedema tummy, protruding scales, exophthalmia in eyes sockets (eyes trauma), pale gills, increased respiratory rate, oedema anus, redness skin, redness fins in fish body.

It is frequently associated with exophthalmia due to retrobulbar effusion, which may be unilateral or bilateral (Lewbart et al., 1998)

4. Dropsy cases circumstance

Urogenital diseases in fish vary according to fish species. This excess fluid is removed from the body through surgery. Another reason for swelling is that ovulation occurs late in the ovulation season, or no ovulation is observed. These eggs remain in the creature's abdomen or abdominal cavity and rot. As a result of this decay, swelling is observed. In this case, it can encourage fish with the case to spawn by giving hormones. There may be many environmental reasons that may prevent the kidney from working properly. Other reasons, whether caused by an infection or not, may also cause the kidneys to stop working. Additionally, this may be due to stress of fish (Guardiola et al., 2014).

Kidney failure most commonly observed in fish. PKD causes kidney failure its breakdown by fluid-filled cysts. Swimming disorders may also occur due to PKD. Swollen kidneys compress and displace swim bladders, and this case may fish not be able to even swim. When dropsy occurs in fish, diagnosis of PKD can made by your veterinarian by ultrasound or needle aspiration (Koslow et al., 2023).

In a case, cause ailment by *Vibrio anguillarum*, most damage was detected in the kidney tissue. In histopathological examination, necrosis in interrenal hemopoietic tissue cells, glomerular oedema, tubular oedema and degeneration in tubule epithelial cells and small

hemosiderin accumulations were detected in the kidney tissue of the sick fish. Oedema is a problem in many similar infectious diseases. Treatment is also a symptom that needs attention. Otherwise, it may cause a secondary infection.

In the kidney, sexual dimorphism in gene expression patterns, transporters, responses to injury, as well as PKD progression has been reported (Veiras et al. 2017; Laouari et al., 2022; Neugarten and Golestaneh, 2022). It disrupts the function of organs. In some serious cases, it even causes multiple organ failure.

Although it is said that PKD is caused by parasites, no parasite species have ever been found in living things or in the environment. In some cases, the disease goes away on its own; It has been observed that some of them disappear with hyperosmotic treatment. These observation rates are quite low. Generally speaking, there is no treatment for PKD (Rizkiantino et al., 2023).

5. Dropsy diagnosis

Clinical examination of fish with tummy oedema is frequently limited but using gentle palpation differentiate between presence of fluid or solid mass in tummy. Ballotement can be used to detect mass within fluid-filled tummy cavity (Roberts and Pearson, 2005).

Laparoscopy and laparotomy are uses in some tummy cases (Nagy and James, 1989). Diagnostic imaging is a surgical tool in the diagnosis of fatal or non-fatal abdominal edema in fish. Magnetic resonance imaging and computed tomography devices are used for abdominal lesions. It requires anesthesia so that radiography can show gas and space-occupying lesions within the body cavity. The gas-filled swim bladder and internal organs are examined with an ultrasonography device. In continuation of the examination of internal organs, examinations are also carried out for vital changes in tissue density and in the abdomen and its surroundings where abnormal fluid has accumulated (Lewbart et al., 1998; Wildgoose et al., 2007). The subject of molecular examination of fluid taken from the abdomen is included in some literature.

6. Dropsy prognosis

Since it is a symptom and not a disease, dropsy is dependent on the state of a fish underlying disease and will resolve if that disease can be successfully treated. Dropsy can be fatal due to advanced stage of underlying disease causing excessive turgescing that leads to organ failure (Peitzman 2007).

7. Dropsy treatment

All fish with dropsy should quarantined immediately. A simple change of water and environment can eliminate all symptoms. If symptoms persist in when creature is returned to the main marin environmental, this indicates that there is a hidden stressor in the marin and must be eliminated (Vajargah, 2022).

Spontaneous recovery rarely occurs. For fish that continue to eat, the amount of feed is reduced. No feed changes are

made. Vitamin C supplementation is given. Antibiotic feeds are soaked and given. Metronidazole 1 tablet / 50 lt, 50% of the water changes after 24 hours. The same dosage is repeated, waited for 3 days, and if the swelling does not subside, repeat (Pal and Lal, 2023).

8. Result and discussion

In a manuscript, Koslow et al., 2023 reported that decided to take two approaches to assess conservation of zebrafish for PKD study. First approach, researchers assessed molecular conservation by querying how many cystic kidney disease genes have their corresponding zebrafish homologs. And researchers found that out of 82 genes that cause renal cysts, zebrafish have homologs for 81 of these genes. Second approach, researchers compared gene expression between male and female fish kidneys and noted obvious differences. Among the differentially expressed signaling pathways, researchers noted a remarkable 37.9% similarities to a previously established rodent PKD model. Together, the point in question studies indicate zebrafish a valuable model for studying PKD.

William H. Wildgoose 2007 reported that A Clinician's Approach to Internal Disorders of Fish: Abdominal Swelling topic manuscript explained tummy oedema and diseases related to this symptom essential points. Although the example of zebrafish kidney problem is generally given as a case in this review article, dropsy causes serious dangers for every fish.

Severe edema was observed in the lamellar epithelium, gills (Küçük, 2019), between cells, pericardial region, and yolk sac, toxicity and teratogenicity (Turhan, 2023). Pericardial edema and yolk sac oedema are observed more frequently than other types of malformations (Uçar and Atamanalp, 2008).

Although several experience specific disease problems most cases of tummy oedema must be enquired in a systematic manner due to different underlying causes. However, in many disease cases, both surgical treatments and medical attentions are often unrewarding. In case euthanasia is frequently the best option for affected fish.

Based on the case examples of researchers explained in discussion, it is recommended in this review article to investigate the factors underlying dropsin at a more molecular level. Also, oedema supports the claim regarding toxicity and teratogenicity.

Although dropsy-infected seems like a problem that can be solved with surgery, underlying cause must be investigated. Uncontrolled fluid accumulation in symptom of dropsy adversely affects internal organs and can be fatal in persistent cases.

Authors' contributions

Conceptualization, Validation, Investigation, Screening literatures, Data Curation, Writing - Original Draft, Writing, Approved final version.

References

- Emmett M, Seldin DW. 1997. The Pathophysiology of Edema Formation: General Concepts. "Diuretic Agents: Clinical Physiology and Pharmacology, Chapter V(A1)" içinde, Academic Press-Elsevier, Cambridge, Massachusetts.
- Freire MAM, Rocha GS, Bittencourt LO, Falcao D, Lima RR, Cavalcanti JRLP. 2023. Cellular and molecular pathophysiology of traumatic brain injury: what have we learned so far?. *Biolo.* 12(8): 1139.
- Goljan EF. 2019. *Rapid Review Pathology.* 5th ed., Elsevier, Philadelphia.
- Guardiola FA, Cuesta A, Abellán E, Meseguer J, Esteban MA. 2014. Comparative analysis of the humoral immunity of skin mucus from several marine teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* 40(1): 24-31.
- Koslow M, Zhu P, McCabe C, Xu X, Lin X. 2023. Kidney transcriptome and cystic kidney disease genes in zebrafish. *Front Physiol.* 14: 1184025.
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC. 2015. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease.* 9th ed., Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Küçük S. 2019. Akut bakır konsantrasyonlarına maruz bırakılmış pangasus balıklarında (*Pangasius hypophthalmus*) saptanan hematolojik ve histolojik değişimler. *Ege Jour Fish Aqu Sci.* 36(4): 387-396.
- Laouari D, Vergnaud P, Hirose T, Zaidan M, Rabant M, Nguyen C, Burtin M, Legendre C, Codogno P, Friedlander G, Anglicheau D, Terzi F. 2022. The sexual dimorphism of kidney growth in mice and humans. *Kid. Inter.* 102(1): 78-95. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2022.02.027>.
- Lewbart GA, Spodnick G, Barlow N, Love NE, Geoly F, Bakal RS. 1998. Surgical removal of an undifferentiated sarcoma from a koi. *Vet Rec.* 143: 556-558. DOI: 10.1136/vr.143.20.556
- Nagy AG, James D. 1989. Diagnostic laparoscopy. *A J Sur* 157(5): 490-493.
- Neugarten J, Golestaneh L. 2022. Sex differences in acute kidney injury. *Semin Nephrol.* 42: 208-218. doi:10.1016/j.semnephrol.2022.04.010
- Pal D, Lal P. 2023. Medicinal Plants Against Neurological Viral Diseases: Ethnopharmacology, Chemistry, Clinical, and Preclinical Studies. In *Anti-Viral Metabolites from Medicinal Plants (1-64)*. Cham: Springer International Publishing.
- Peitzman SJ. 2007. Dropsy, dialysis, transplant: a short history of failing kidneys. JHU Press.
- Rahmaningsih S. 2012. *Jurnal Ilmu Perikanan dan Sumberdaya Perairan*, 1: 1-7.
- Rizkiantino R, Laiman H, Haliman RW, Halalludin B, Wisoyo D, Ardini Y, Khanaria G, Fitriana RN, Panjaitan BV, Asih Y, Yadiansyah R I. 2023. Clinical Case Study of Non-infectious Dropsy in Koi. *Jour Sur Fish Sci.* 631-650.
- Roberts RJ, Pearson MD. 2005. Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis.* 28(7): 383-390.
- Scallan J, Huxley VH, Korthuis R.J. 2010. *Capillary Fluid Exchange: Regulation, Functions, and Pathology.* Morgan & Claypool Life Sciences. San Rafael (CA)
- Sen K, Mandal R. 2018. Fresh-water fish diseases in west Bengal, India. *Inter. Jour. Fish. Aqu. Stud.* 6(5): 356-362.
- Stokoe WM. 1966. The Management and Diseases of Fish—IV Some Common Bacterial, Viral, Fungal and Non-specific Diseases of Aquarium Fish. *J Sm Ani Prac.* 7(12): 809-818.
- Turhan DÖ. 2023. Diklofenak Sodyumun Zebra Balığı (*Danio rerio*) Larvaları Üzerindeki Teratojenik ve Gelişimsel Toksisitesinin Değerlendirilmesi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tar Doğ Der.* 26(1): 185-193.

- Uçar A, Atamanalp M. 2008. Balıklarda toksikopatolojik lezyonlar II/toxicopathological lesions in fish II. Atatürk Üniversitesi Zir. Fak. Der. 40(1): 95-101.
- Vajargah MF. 2022. A review of abdominal dehydration (dropsy). Journal ISSN, 2766, 2276.
- Veiras LC, Girardi ACC, Curry J, Pei L, Ralph DL, Tran A, Castelo-Branco RC, Pastor-Soler N, Arranz CT, Yu ASL, McDonough AA. 2017. Sexual dimorphic pattern of renal transporters and electrolyte homeostasis. J Am Soc Nephrol. 28: 3504–3517. doi:10.1681/ASN.2017030295.



EJBCS