

eISSN: 2564-6524



ANKARA ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
DERGİSİ

JOURNAL OF FACULTY OF PHARMACY
OF
ANKARA UNIVERSITY

Cilt / Vol : 45
Sayı / No : 2
Yıl / Year : 2021

eISSN: 2564-6524



**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
DERGİSİ**

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

**Cilt / Vol: 45
Sayı / No: 2
Yıl / Year: 2021**

ANKARA ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ DERGİSİ

(Ankara Ecz. Fak. Derg.)

eISSN: 2564-6524

Sahibi:

Prof. Dr. Asuman BOZKIR

Baş Editör:

Prof. Dr. İlkay YILDIZ

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı,
06560 Yenimahalle-ANKARA,
Tel: 0 312 203 30 69
Faks: 0 312 213 10 81
e-posta: iyildiz@pharmacy.ankara.edu.tr*

Yardımcı Editörler:

Prof. Dr. Canan HASÇİÇEK

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

Doç. Dr. Işıl ÖZAKÇA GÜNDÜZ

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

Alan Editörleri:

Doç. Dr. İlker ATEŞ

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

Doç. Dr. Özgür ÜSTÜNDAĞ

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

Doç. Dr. Ceyda Tuba ŞENGEL TÜRK

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

Doç. Dr. Özge ÜLKER

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

Doç. Dr. Banu KAŞKATEPE

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

Doç. Dr. Kayhan BOLELLİ

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

Dr. Öğr. Üyesi Ash KOÇ

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

Dr. Burçin ERGENE

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

Dr. Zuhâl KILIÇ KURT

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

Dr. M. Mesud HÜRKUL

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

Dr. Gizem GÜLPINAR

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

Dr. Berna GÜVEN

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

Dr. Derya ÇİÇEK POLAT

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

Dr. Ecem KAYA SEZGİNER

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

Dr. Aysu SELÇUK

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

Uzm. Ecz. Melek KARACAOĞLU

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

Editorial Danışma Kurulu:

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

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi (*Ankara Ecz. Fak. Derg.*) Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nin resmi bilimsel bir dergisidir. 1971 ve 2010 yılları arasında basılı olarak yayımlanmıştır.

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi yılda 3 sayı olarak (Ocak-Mayıs-Eylül) yayımlanır. Bu dergi açık erişim, hakemli bir dergi olup, Türkçe veya İngilizce olarak farmasötik bilimlerdeki önemli gelişmeleri içeren orijinal araştırmalar, derlemeler ve kısa bildirimler için uluslararası bir yayın ortamıdır. Yayımlanan yazıların sorumluluğu yazar(lar)ına aittir. Dergiye gönderilen makalelerin daha önce tamamen veya kısmen başka bir yerde yayımlanmamış veya yayımı için başka bir yere başvuruda bulunulmamış olması gereklidir. Makaleler derginin yazım kurallarına uymalıdır.

Tarandığı İndeksler

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

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

JOURNAL OF FACULTY OF PHARMACY OF ANKARA UNIVERSITY

(J. Fac. Pharm. Ankara)

eISSN: 2564-6524

Owner:

Prof. Dr. Asuman BOZKIR

Editor-in-Chief:

Prof. Dr. İlkay YILDIZ

*Ankara University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry
06560 Yenimahalle-Ankara/TURKEY
Tel: 0 312 203 30 69
Fax: 0 312 213 10 81
e-mail: efd.editor@ankara.edu.tr*

Associate Editors:

Prof. Dr. Canan HASÇİÇEK

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

Assoc. Prof. Dr. Işıl ÖZAKÇA GÜNDÜZ

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

Section Editors:

Assoc. Prof. Dr. İlker ATEŞ

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Toxicology

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

Assoc. Prof. Dr. Özgür ÜSTÜNDAĞ

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry

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

Assoc. Prof. Dr. Ceyda Tuba ŞENGEL TÜRK

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology

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

Assoc. Prof. Dr. Özge ÜLKER

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Toxicology

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

Assoc. Prof. Dr. Banu KAŞKATEPE

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology

e-mail: bkaskatepe@ankara.edu.tr

Assoc. Prof. Dr. Kayhan BOLELLİ

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry

e-mail: bolelli@ankara.edu.tr

Assist. Prof. Dr. Aslı KOÇ

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry

e-mail: akoc@ankara.edu.tr

Dr. Burçin ERGENE

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy

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

Dr. Zuhâl KILIÇ KURT

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry

e-mail: zkurt@ankara.edu.tr

Dr. M. Mesud HÜRKUL

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany

e-mail: mhurkul@ankara.edu.tr

Dr. Gizem GÜLPINAR

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

e-mail: gaykac@ankara.edu.tr

Dr. Berna GÜVEN

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology

e-mail: bguven@ankara.edu.tr

Dr. Derya ÇİÇEK POLAT

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany

e-mail: polatd@ankara.edu.tr

Dr. Ecem KAYA SEZGİNER

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry

e-mail: ecemkaya@ankara.edu.tr

Dr. Aysu SELÇUK

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Clinical Pharmacy

e-mail: aysuselcuk@ankara.edu.tr

Pharm. MSc. Melek KARACAOĞLU

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy

e-mail: mkaracaoglu@ankara.edu.tr

Editorial Advisory Board:

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

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

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

Indexing and Abstracting

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

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

İÇİNDEKİLER / CONTENTS 45(2), 2021

Özgün Makaleler / Original Articles

Sayfa / Page

- Ömer AKGÜL, Kadir BAKAN - **THE AEROBIC BACTERIA ISOLATED FROM USED COSMETIC PRODUCTS AND EVALUATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE - KULLANILMIŞ KOZMETİK ÜRÜNLERDEN İZOLE EDİLEN AEROP BAKTERİLER VE ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ** 156
- Ayşegül BÜKÜLMEZ, Ayşegül KÖROĞLU, Zeynep YEŞİLDAĞ, Gülmira ÖZEK - **İNFANTİL KOLİKLİ BİR BEBEKTE ELMA YAĞI NEDENLİ UYKUYA EĞİLİM - APPLE OIL-INDUCED SLEEP TENDENCY IN AN INFANTILE COLIC BABY** 169
- Gül BAYRAM, Abdoul NZEYIMANA, Semra UTKU, Mahmut ÜLGER, Gönül ASLAN, Erdoğan BERÇİN - **STUDY ON SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF SOME MICHAEL-TYPE ADDITION COMPOUNDS - BAZI MICHAEL TİPİ KATIM ÜRÜNLERİNİN SENTEZ ÇALIŞMASI VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ** 182
- Muammer ÇALIKUŞU, Gülsen GÜNEŞ, Gülbın ÖZÇELİKAY - **COVID-19 PANDEMİSİNİN TOPLUM ECZACILIĞI HİZMETLERİNE ETKİLERİ - THE EFFECTS OF COVID-19 PANDEMIC ON COMMUNITY PHARMACY SERVICES** 194
- Md Amjad BEG, Mustafa SEVİNDİK, Shahid Tanweer HAIDER, Preeti SONI, Priya BHATIA, Shahzul HASAN, Richa YADAV, Fareeda ATHAR - **MOLECULAR BASIS AND INTEGRATIVE ANALYSIS OF Rv1463 AS PROBABLE CONSERVED ATP-BINDING PROTEIN BY COMPUTATIONAL APPROACH - RV1463 OLASI KORUNMUŞ ATP BAĞLAYICI PROTEİNİN HESAPLAMALI YAKLAŞIMLA MOLEKÜLER TEMEL BÜTÜNLEŞTİRİCİ ANALİZİ** 212
- Begum EVRANOS AKSÖZ, Fatma KAYNAK ONURDAĞ, Erkan AKSÖZ, Selda ÖZGEN ÖZGACAR - **BAZI 4,5-DİHİDRO-1H-PİRAZOL VE ŞALKON TÜREVLERİNİN ANTİMİKROBİYAL VE ANTİTÜBERKÜLER ETKİLERİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR - INVESTIGATIONS ON ANTIMICROBIAL AND ANTITUBERCULAR ACTIVITY OF SOME 4,5-DIHYDRO-1H-PYRAZOLE AND CHALCONE DERIVATIVES** 227
- Ayşe Arzu ŞAKUL, Mehmet Evren OKUR - **BETA-SİTOSTEROL AND ITS ANTINOCICEPTIVE MECHANISM ACTION - BETA-SİTOSTEROL VE ANTİNOSİSEPTİF ETKİ MEKANİZMASI** 238
- Shripad BAIRAGI, Prashant GHULE, Ritu GILHOTRA - **IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF β- SİTOSTEROL IN LEAF OF CALOTROPIS GIGANTEA AND CALOTROPIS PROCERA BY HPTLC - HPTLC İLE CALOTROPIS GIGANTEA VE CALOTROPIS PROCERA YAPRAĞINDAKİ β-SİTOSTEROLÜN TANIMLANMASI VE MİKTAR TAYİNİ** 253
- Mehmet KOCA, Emrah ÖZAKAR, Rukiye SEVİNÇ ÖZAKAR - **TRİİODOANİLİNİN SENTEZLENMESİ, NANOSÜSPANSİYONLARININ HAZIRLANMASI, İN VİTRO KARAKTERİZASYONU VE RADYOKONTRAST ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ - SYNTHESIS OF TRIODOANILINE, PREPARATION OF NANOSUSPENSIONS, IN VITRO CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF RADIOCONTRAST PROPERTIES** 264
- Malayappan Maria JULIE, Thirutanasambantam PRABU, Fazilath Basha ASIF, Sambanthan MUTHU - **İN SILICO DRUG EVALUATION AND DRUG RESEARCH OF BIOACTIVE MOLECULE METHYL 4-BROMO-2-FLUOROBENZOATE- BİYOAKTİF MOLEKÜL METİL 4-BROMO-2-FLOROBENZOATIN İN SİLİKO İLAÇ**

DEĞERLENDİRMESİ VE ARAŞTIRMASI	284
Süleyman KAYAN, Nurten ALTANLAR - HASTANELERDE SIKLIKLA KULLANILAN BAZI DEZENFEKTAN VE ANTİSEPTİKLERİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI - INVESTIGATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF SOME DISINFECTANTS AND ANTISEPTICS WHICH ARE FREQUENTLY USED IN HOSPITALS	297
Gülnur EKŞİ, Gülderen YILMAZ, Mehmet BONA, Ayşe Mine GENÇLER ÖZKAN - CUPANIOSCORDUM SEKSİYONUNA AİT ÜÇ ALLIUM L. (AMARYLLIDACEAE) TÜRÜNÜN YAPRAK VE SKAPUS ANATOMİSİ - LEAF AND SCAPE ANATOMY OF THREE ALLIUM L. (AMARYLLIDACEAE) SPECIES FROM SECT. CUPANIOSCORDUM	309
Anastasiia DONCHENKO, Katerina MIEDVIEDIEVA, Olexsii VOSKOBOINIK, Svitlana VASYUK, Serhii KOVALENKO - STUDY OF THE STRUCTURE OF PRODUCTS OF INTERACTION BETWEEN SOME NAPHTHOQUINONE DERIVATIVES AND PHARMACEUTICAL SUBSTANCES - BAZI NAFTOKİNON TÜREVLERİ İLE İLAÇ MADDELERİ ARASINDAKİ ETKİLEŞİM ÜRÜNLERİNİN YAPISININ İNCELENMESİ	321
Aayushi CHANDERİYA, Ratnesh DAS - FABRICATION OF ELECTROCHEMICAL NANOSENSOR BASED ON CuO AND GRAPHITE POWDER AND ITS APPLICATION FOR TRACE ANALYSIS OF OP (ORGANOPHOSPHORUS) PESTICIDES IN REAL SAMPLES - CuO VE GRAFİT TOZUNA DAYALI ELEKTROKİMYASAL NANOSENSÖR İMALATI VE GERÇEK NUMUNELERDE OP (ORGANOFOSFOR) PESTİSİTLERİNİN ESER MADDE ANALİZİ İÇİN UYGULAMASI	332
<i>Derlemeler / Reviews</i>	
Ceren ÖZTÜRK, Funda ATİLA - MANTARLARIN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ İLE İLGİLİ İN VİTRO, İN VİVO VE KLİNİK DEĞERLENDİRMELER - IN VITRO, IN VIVO AND CLINICAL ASSESMENT ABOUT THE MEDICINAL CHARACTERISTICS OF MUSHROOMS	344
Cenk YILDIZ, Burcu DEVRİM - PULMONER ARTERİYEL HİPERTANSİYON TEDAVİSİNDE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR - CURRENT APPROACHES IN PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION TREATMENT	379
İrem Nur ÇELİK, Firdevs Kübra ARSLAN, Ramazan TUNÇ, İlkay YILDIZ - İLAÇ KEŞFİ VE GELİŞTİRİLMESİNDE YAPAY ZEKÂ - ARTIFICIAL INTELLIGENCE ON DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT	400
Mahmut Ozan TOKSOY, Fahriye Figen TIRNAKSIZ - KATI LİPİT NANOPARTİKÜLLER VE BEYNE ÖZGÜ İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM OLARAK UYGULAMALARI - SOLID LIPID NANOPARTICLES AND APPLICATIONS AS BRAIN SPECIFIC DRUG DELIVERY SYSTEMS	428
Nuran COŞKUN, Özge CEMİLOĞLU ÜLKER - COVID-19 TEDAVİSİNDE İLAÇ-İLAÇ ETKİLEŞİMLERİNİN FARMAKOKİNETİK AÇIDAN DEĞERLENDİRİLMESİ - PHARMACOKINETIC EVALUATION OF DRUG-DRUG INTERACTIONS IN THE TREATMENT OF COVID-19	443



THE AEROBIC BACTERIA ISOLATED FROM USED COSMETIC PRODUCTS AND EVALUATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE

KULLANILMIŞ KOZMETİK ÜRÜNLERDEN İZOLE EDİLEN AEROP BAKTERİLER VE ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ömer AKGÜL^{1*} , Kadir BAKAN² 

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

²Van Yüzüncü Yıl University, Instituted of Health Sciences, Department of Pharmaceutical Microbiology, 65080, Van, Turkey

ABSTRACT

Objective: Today, cosmetics sector is one of the thousands of sectors that are inspected within the scope of protection of people's health, preventive health measures, investments made for health rather than illness, and projects made in the name of raising awareness of people without getting sick. Cosmetics need to be produced and maintained in healthy conditions to minimize unwanted effects. The aim of this study is to evaluate the aerobic bacterial contamination of used cosmetic products and the resistance profile (carbapenem and extended-spectrum beta-lactamase) of isolated bacteria.

Material and Method: Five hundred samples were made from used cosmetic products. Microbiological evaluation was performed using culture, biochemical tests, Vitek 2 and polymerase chain reaction (PCR) from the samples.

Result and Discussion: In this study, used cosmetic products were collected from 500 cosmetic users. A total of 101 (20.2%) bacteria were isolated from used cosmetic products (n = 500). As a result of identification performed on Vitek 2 device, *S. epidermidis* (47, 46.5%), *S. hominis* (17, 16.8%), *S. aureus* (6, 5.9%), *E. coli* (16, 15.8%), *K. pneumoniae* (11, 10.9%) and *P. aeruginosa* (4, 4.1%). Result of phenotypic antibiotic resistance evaluation revealed that 1 isolate was methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and it was *mecA* gene positive. It was determined that the isolated 10 gram negative bacteria showed a profile of carbapenem and extended-spectrum beta-lactamase resistance. Only three *K. pneumoniae* strains were found to carry the *bla*_{OXA-48} gene in these isolates. In this study, it was concluded that the cosmetic products may cause serious infections associated with poor personal hygiene, prolonged use, and the bacterial contamination rate of the environment.

Keywords: Contamination, cosmetic product, microbiology

* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Ömer Akgül
e-mail / e-posta: o.akgul@yyu.edu.tr, Phone / Tel.: +904324445065

ÖZ

Amaç: Günümüzde insanların sağlığını koruma, koruyucu sağlık tedbirleri, hastalığa değil sağlığa yönelik yapılan yatırımlar ve kişiyi hastalanmadan bilinçlendirme adına yapılan projeler kapsamında denetlenen binlerce sektörden biri de kozmetik sektörüdür. Kozmetiklerin istenmeyen etkilerini en aza indirmek için sağlıklı koşullarda üretilip korunması gerekmektedir. Bu çalışmanın amacı, kullanılan kozmetik ürünlerin aerobik bakteriyel kontaminasyonunu ve izole edilen bakterilerin direnç profilini (karbapenem ve genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz) değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Kullanılmış kozmetik ürünlerden beş yüz örnekleme yapıldı. Örneklerden kültür, biyokimyasal testler, Vitek 2 ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak mikrobiyolojik değerlendirme yapıldı.

Sonuç ve Tartışma: Bu çalışmada, 500 kozmetik ürün kullanıcısından, kullanılan kozmetik ürünler toplandı. Kullanılmış kozmetik ürünlerden (n=500) toplamda 101 (%20,2) bakteri izolasyonu yapıldı. Vitek 2 cihazında gerçekleştirilen identifikasyon sonucunda izolatların sırasıyla *S. epidermidis* (47, %46,5), *S. hominis* (17, %16,8), *S. aureus* (6, %5,9), *E. coli* (16, %15,8), *K. pneumoniae* (11, %10,9) ve *P. aeruginosa* (4, %4,1) olduğu belirlendi. Fenotipik antibiyotik direncinin değerlendirmesi sonucunda 1 izolatın metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) ve *mecA* geni pozitif olduğu görüldü. İzole edilen 10 gram negatif bakterinin karbapenem ve genişletilmiş-spektrumlu β -laktamaz direnci profili gösterdiği belirlendi. Bu izolatlarda sadece üç *K. pneumoniae* suşunun *blaOXA-48* geni taşıdığı belirlendi. Bu çalışmada, kozmetik ürün kullanımında kötü kişisel hijyen, uzun kullanımı zaman, ortamın bakteriyel kontaminasyon oranı ile ilişkili ciddi enfeksiyonlara maruz kalılabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Kontaminasyon, kozmetik ürün, mikrobiyoloji

INTRODUCTION

The term ‘cosmetics’ has been derived from the Greek word “kosmetikos,” which means skilled in adornment or arrangement in Greek. From past to present, having a beautiful and well-groomed appearance has always been important. Although the sense of beauty varies by the current age and conditions, the use of cosmetic products has always been found the basis of beauty at every age [1]. The very first findings on the use of cosmetics have been found in Egypt. The bowls found in the graves that were found and examined in Egypt during the archeological diggings and cream containers that are still fragrant for years indicate that cosmetics have still been widely used for centuries. It is known that these products, which are used for beauty, are obtained from nice-smelling plants, seeds, and oils, and mainly clergymen prepared them in the past [2].

The Europe Cosmetics Directive ensures that cosmetics are produced to high standards to ensure the safety of consumers. Testing should be carried out to assess the physical and chemical properties and stability of the product, and to find out its microbiological and toxicological results as well [3]. Today, new technologies and systems are being developed in the cosmetic products packaging industry to prevent microbial contamination. However, even if these products are packaged perfectly, contamination can occur for various reasons. Products are exposed to contamination during production, storage, transportation, sales, and service operations. The most microbial contamination occurs in raw materials such as natural substances, carbohydrates, alcohol, glycoside, oil, and protein [4].

The risk of infection that may occur in an eye increases with the contamination of eye cosmetic products used in daily life. Contamination by microorganisms can occur usually in the products that

highly contact with the eyes during their usages such as contact lenses, cleaning solutions, or soft lenses. Serious infections can be seen in the inner and outer lid of the eye after the use of contaminated eyeliners. It was detected that the contamination occurs especially with gram-negative bacteria [5]. *Pseudomonas aeruginosa*, which may cause serious infections, can be detected in eye products, especially in eye shadows and mascaras [6]. Although mouthwashes and toothpaste contain antimicrobial preservatives, they are still subject to significant amounts of bacterial and fungal contamination. *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida* spp. often perform contamination. It was detected that toothpaste is more frequently contaminated than mouthwashes [7]. Highly contaminated products that are used for skincare may cause skin infection or allergic reactions in users. *P. aeruginosa*, which is infected from creams, lotions, cellulose bandages, and plaster bandages, may cause serious infections [5]. Shampoos are susceptible to the growth of gram-negative bacteria because of the amount of water they contain. No defect occurs because of contamination, however, changes such as bad smell, different color formation, foaming, and thin layer formation can be observed in products [8]. Shampoos are most contaminated with *Enterobacteriales* and *Pseudomonas* species [9].

This study aimed to investigate the contamination risk of aerobic bacteria in cosmetic products used by people living in the Van region of Turkey, to evaluate phenotypically and genotypically the antibiotic resistance they have, and to determine their effects on public health.

MATERIAL AND METHOD

Isolation and Identification of Bacteria, and Antibiogram Test

Used cosmetic products were collected from 500 cosmetic product users in the Van region of Turkey. The cosmetic products were divided into groups regarding their durations of use (Table 1). The sampling method was determined according to whether the products were liquid, semi-solid, and solid. 1 mL samples of liquid products and 1 gr samples of semi-solid and solid products were collected in this way, sampling was completed. The samples were inoculated into the medium containing 8.5 mL of pre-prepared Brain Heart infusion Broth (BHI, Oxoid, UK) and 0.5 mL of Tween 80. The bottles in which growth was detected were inoculated into 5% sheep-blooded agar base (Acumedia, USA), McConkey Agar (Oxoid, UK), and Eosin Methylene Blue agar (EMB, Oxoid, UK). The cultures were left for incubation at 37 °C for 72 hours. The colony morphology of the cultures was evaluated. Their biochemical tests such as the Catalase test, Oxidase test, and Gram staining were carried out. Vitek 2 Compact (Biomérieux, USA) system was used for the identification of the bacteria and antibiogram test [10]. Screening of cefoxitin, benzylpenicillin, ampicillin, oxacillin, gentamicin, ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, inducible clindamycin resistance, erythromycin, clindamycin, quinupristin/dalfopristin, linezolid, vancomycin, tetracycline, tigecycline, nitrofurantoin, rifampin, trimethoprim/sulfamethoxazole was used for phenotypically antibiotic susceptibility analysis and evaluation was

made according to minimal inhibitory concentration (MIC, $\mu\text{g}/\text{mL}$) value [11]. The identified bacteria were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Table 1. Used cosmetic products and their distribution by the duration of use.

Used Cosmetic Products	Duration of Use of Cosmetic Products			
	3 Months	6 Months	9 Months	12 Months
Hand and Face Cream	18	7	9	3
Sunscreen	21	13	8	4
Toothpaste	9	7	4	2
Hand and Body Lotion	11	14	8	8
Tonics	17	8	4	4
Masks	14	10	6	6
Serums	5	7	9	7
Body Oils	17	12	7	14
Hair Products	8	5	6	3
Lipsticks	21	12	11	9
Mascaras	7	7	8	2
Cleansing Gels	13	11	7	16
Foundations	19	9	6	4
Makeup Pencils	8	6	8	1

Bacterial DNA Extraction and Amplification

Bacterial DNA extraction was performed at the Pharmaceutical Microbiology Laboratory of the Faculty of Pharmacy, Van Yüzüncü Yıl University. The bacteria stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ were thawed at room temperature. They were inoculated into Trypton Soy Agar (Acumedia, USA) and were incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 hours. Then, the DNAs of *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *S. aureus* strains were obtained using G-Spin™ Total DNA Extraction kit (IntronBio, Korea) protocol. The bacterial DNA samples were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Bacterial DNA amplification was carried out by taking Sahebnaşagh et al. [12] and Poirel et al. [13] studies as references. $5\text{ }\mu\text{L}$ of template DNA, $200\text{ }\mu\text{M}$ of deoxynucleotide triphosphate (Life Technologies) each, $1,5\text{ U}$ Taq DNA polymerase (abm, Canada), buffer (20 mM Tris-HCL, 50 mM KCL), and 3 mM MgCl_2 (Biotools) were adjusted to be a $50\text{ }\mu\text{L}$ of final solution for PCR. The PCR conditions were arranged to be 2 min at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 sec at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ (denaturation), 45 sec at $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ (annealing), 60 sec at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ (extension), 5 min at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Amplicon products were run at Thermo EC300XL2 electrophoresis device at 100 Volts for 1,5 hours on 1,5% agarose gel. Amplicons were visualized using Bio-Print- ST4 (Vilber Lourmant, France) device. DNA amplification of the isolated and identified bacteria was performed using the reference primers in Table 2.

Table 2. Reference oligonucleotide sequences used in the study.

Gene Region	Primer Sequence	Base Size	Reference
<i>mecA</i>	F: 5'-CCAATTCCACATTGTTTCGGTCATA-3' R: 5'-GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA-3'	310 bp	[12]
<i>bla_{OXA-48}</i>	F: 5'- GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3' R: 5'- CATCAAGTTCAACCCAACCG -3'	438bp	[13]
<i>bla_{IMP}</i>	F: 5'- GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC-3' R: 5'- GGTTAATAAAAACAACCACC-3'	232bp	[13]

RESULT AND DISCUSSION

The products may be contaminated when applying by users and especially it may be observed that unwanted microorganisms may contaminate the products at varying rates [3]. These products, which are contaminated by the time they are used for the first time, may contain microorganisms that pose serious risks on public health and cause concern for health such as *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus*. Cosmetic products containing these microorganisms may pose a serious threat of infection after they are applied especially on the mouth and eye region [4]. In several studies, it was emphasized that cosmetic products that contained *S. aureus* and *E. coli* were important potential pathogen carriers [15, 16]. Although we are protected from infections, serious infections may occur because of microorganisms passing through cuts and scratches on the skin along with ineffective sanitation practices during the use of products. *Staphylococcus* species are commensal organisms found on the skin. Especially *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. cohnii*, and *S. capitis* were isolated from mascaras, eyeliners, and lip glosses [3]. *S. capitis* is found commonly in the facial region and plays a role in the contamination of cosmetic products. *S. capitis* takes part in the formation of septicemia in premature children and endocarditis infections in individuals in whom pacemakers are implanted [17, 18]. *S. haemolyticus* exists in the axilla, perineum, and umbilical region. The agent, which causes hospital infections, is known to play a serious role especially in urinary tract infections [19].

In a study conducted in the UK, microbiological contamination rates were analyzed in a total of 467 products including lip glosses (107), mascaras (93), eyeliners (92), lip liners (96), and makeup sponges (79). It was reported that the analyzed products were contaminated with 48 bacteria. The highest contamination was reported to be in the makeup sponges. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and *Enterobacteriales* species were found to play an important role in the contamination [3]. It was observed in some studies that *Salmonella*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, and *P. aeruginosa* emerged from mascaras, eyeliners, and face powders [6, 14]. Lip glosses and lipsticks were found to serve as important carriers in terms of *Escherichia hermannii*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, and *Enterobacter* species [20]. *S. epidermidis*, *Bacillus* spp., *E. coli*, and *S. aureus* species were found to be the most common bacteria in the mascara samples. After the identification carried out on lipsticks, *S. aureus* was

reported to have a significant role in their contamination. In the eyeshadow and foundation samples, *Streptococcus* and *Bacillus* species were reported to be more common [15]. Jung et al. [21] investigated the presence of bacterial contamination in lip glosses and lipsticks that were used by 16 dentists. They revealed contamination in which *P. putida*, *Bacillus* spp., *Staphylococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis*, and *S. aureus* were effective. In a study conducted in Turkey, the presence of bacteria that cause microbiological contamination in cosmetic products (Mouthwash, tooth cleaning powder, and teeth pad) used for oral and dental health was investigated. Gram-negative bacteria and Coagulase negative *Staphylococci* (CNS) agents were reported to play a significant role in the contamination of all three cosmetic products. In the tooth-cleaning powder, it was revealed that the contamination with *E. coli* was more than it was in the other products [22]. In our study, microbiological contamination levels were investigated in a total of 100 used cosmetic products including 53 lipsticks, 24 mascaras, and 23 makeup pencils. CNS (12 *S. epidermidis* and 2 *S. hominis*), 2 *S. aureus*, and 3 *E. coli* were isolated from the cosmetic products. The fact that *S. aureus* and *E. coli* strains are associated with serious infections in the isolated products showed that the risk was significant. It was observed that people should be careful during the use of products. Regarding the oral health, in consequence of the analysis of bacterial contamination observed in the 22 used tubes of toothpaste, 9 *S. epidermidis*, 4 *S. hominis*, 1 *S. aureus*, and 1 *K. pneumoniae* were isolated. It was observed that users could be exposed to important microorganisms in tubes of toothpaste.

In a study Lundov and Zachariae [23] conducted between 2005 and 2008, they reported that the highest strain isolated from 24 different used cosmetic products was *P. aeruginosa* (%42). In a study conducted in Iran, it was reported that the highest rate of contamination in 24 used moisturizing creams and hand and face creams belonged to gram-positive bacilli (54%). The second-most common bacterium was revealed to be *S. aureus* (38%). The *E. coli* incidence in used cosmetic creams was reported to be 13%. The concentration of other gram-negative bacteria in used creams was found to be only 8% [24]. Bacterial contamination in eye and skin cosmetic products used in beauty salons was observed to be quite high. Regarding the used skin cosmetic products (loose and cream powder), it was observed that *Streptococcus* (32%), *Pseudomonas* (23%), *Acinetobacter* (19%), *Bacillus* (11%), *Staphylococcus* (6%), and *E. coli* (4%) were isolated the most. It was reported that *Streptococcus* (25%), *Pseudomonas* (24%), *Acinetobacter* (10%), *Staphylococcus* (10%), *Bacillus* (8%), *E. coli* (8%), *Salmonella* (4%), *Klebsiella* (4%), and *Citrobacter* (2%) were isolated the most in the used eye cosmetic products (mascara and eyeliner) [14]. Janetos et al. [25] reported that they detected 120 bacterial contaminations in their study on personal care products between 2002 and 2016. They revealed that 120 isolates were *Burkholderia cepacia* (n: 65), *Enterobacter gergoviae* (n: 30), and *P. aeruginosa* (n: 25), respectively. In another study, gram-positive bacilli, *S. aureus*, and gram-negative bacteria (excluding *E. coli*) were assessed in used and unused cosmetic creams. Microorganism contamination rates in the unused creams (38%, 25%,

and 0%, respectively) were determined to be lower when compared with the ones in the used creams (54%, 38%, and 8%) [26]. In our study, a total of 101 (20.2%) bacteria were isolated from used cosmetic products (n=500). As a result of the identification conducted at Vitek 2 system, these isolates were determined to be *Staphylococcus epidermidis* (n=47, 46.5%), *Staphylococcus hominis* (n=17, 16.8%), *S. aureus* (n=6, 5.9%), *E. coli* (n=16, 15.8%), *K. pneumoniae* (n=11, 10.9%), and *P. aeruginosa* (n=4, 4.1%). The bacteria causing contamination were evaluated in 37 hand and face creams, 36 masks, and 50 body oils. Gram-positive and gram-negative bacteria isolated from these cosmetic products were determined to be 11 *S. epidermidis*, 2 *S. hominis*, 1 *S. aureus*, 5 *E. coli*, 3 *K. pneumoniae*, and 1 *P. aeruginosa*, respectively. Bacterial contamination assessment of 47 cleansing gels, 41 hand and body lotions, 33 tonics, 28 serums, and 22 hair products were carried out and a total of 16 medically important bacteria were isolated, including 4 *S. epidermidis*, 7 *S. hominis*, 1 *S. aureus*, 2 *E. coli*, 1 *K. pneumoniae*, and 1 *P. aeruginosa*. Foundation is an important cosmetic product that women use extensively in facial makeup. In our study, 5 *E. coli*, 4 *K. pneumoniae*, and 1 *P. aeruginosa* were isolated from the foundation products collected from 38 different individuals. During the first months of use, contamination in the foundation products were observed to be minimal. However, gram-negative bacterial contamination began to be more detected from the 3rd month (Table 3).

Skin is a delicate, sensitive, and vulnerable protective organ, which covers the outer part of our bodies. At the same time, the skin acts as a shield, which protects our bodies against pathogenic bacteria [27]. It is strongly recommended that the skin not be exposed to direct sunlight for a long time and continuously, and sunscreen be used to prevent wrinkles and skin cancers [27, 28]. Sunscreens are the most common cosmetic products used to protect the skin effectively. However, sunscreens are not sterile [29, 30]. It is not possible to see the microorganism loads that these non-sterile products have with the naked eye. Especially, it was also reported that significant pathogens were playing a role in the contamination in sunscreens [30, 31]. Haftabaradaran et al. [26] revealed the contamination risk occurred in a sample of 90 sunscreens in a study. After the isolation carried out six months later, it was reported that *S. aureus* strains, *P. aeruginosa* strains, and coliform bacteria were identified at a rate of 28.8%, 18.8%, and 8.8%, respectively. 46 used sunscreens from different brands were included in this study. It was observed that gram-positive bacteria activity was more effective in the first three months and then gram-negative activity increased later. In the first three months, while 11 *S. epidermidis*, 2 *S. hominis*, and 1 *S. aureus* were isolated out of 21 sunscreens; only 2 *K. pneumoniae*, 1 *P. aeruginosa*, and 1 *E. coli* were isolated out of the sunscreens that were used for 12 months (Table 3). It was revealed that as the duration of use of sunscreens increased, the incidence of bacterial density that causes significant human infections also increased. It was thought that different contamination rates in sunscreens were affected by user habits, duration of use, and the contamination of the environment.

Table 3. Distribution of gram-positive and gram-negative bacteria isolated from some used cosmetic products in different time intervals

Used Cosmetic Products (n)	Date (Month)	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Hand and face creams (n= 37)	3	-	-	-	-	-	-
	6	1	-	-	2	-	1
	9	3	-	1	-	1	-
	12	2	-	-	-	-	-
Masks (n= 36)	3	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	2	-
	9	2	-	-	1	-	-
	12	-	1	-	-	-	-
Body oils (n= 50)	3	-	-	-	1	-	-
	6	1	-	-	-	-	-
	9	1	-	-	-	-	-
	12	1	1	-	-	-	-
Cleansing gels (n= 47)	3	-	-	-	-	-	-
	6	-	1	-	-	-	-
	9	1	1	1	1	-	-
	12	-	-	-	-	-	-
Hand and body lotions (n= 41)	3	-	-	-	-	-	-
	6	1	1	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-
Tonics (n= 33)	3	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-
	9	-	1	-	-	-	-
	12	1	-	-	-	-	-
Serums (n= 28)	3	-	-	-	-	-	-
	6	-	1	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-
Hair products (n= 22)	3	-	-	-	-	-	-
	6	-	2	-	1	1	-
	9	1	-	-	-	-	1
	12	-	-	-	-	-	-
Foundations (n= 38)	3	-	-	-	1	3	-
	6	-	-	-	1	1	1
	9	-	-	-	3	-	-
	12	-	-	-	-	-	-
Sunscreens (n= 46)	3	11	2	1	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	1	2	1

In the articles studied around the world, no information on the antibiotic resistance characteristics of bacteria isolated from used cosmetic products could be reached. In our study, antibiotic susceptibility test results of the bacteria were evaluated both phenotypically and genotypically. Antibiotic susceptibility test results of the bacteria obtained from the automated Vitek 2 system were given in Table 4 and Table 5. *S. aureus* isolates were found to show the highest antibiotic resistance to benzylpenicillin and gentamicin.

The phenotypic antibiotic evaluation showed that 1 isolate was MRSA. Vancomycin resistance was seen in none of the *S. aureus* isolates. Only one of the *S. aureus* isolates was revealed to show

intermediate susceptibility to benzylpenicillin. It was detected that the highest resistance in the *S. epidermidis* isolates was to benzylpenicillin and ampicillin antibiotics. None of the CNS isolates were observed to have resistance to methicillin and vancomycin. The phenotypic evaluation revealed that the isolates showed intermediate antibiotic resistance to ampicillin, tetracycline, and tigecycline, respectively. *S. hominis* isolates were found to show the highest antibiotic resistance to gentamicin and benzylpenicillin. None of the isolates were found to show resistance to methicillin and vancomycin. It was revealed that the *S. hominis* isolates showed the highest intermediate antibiotic resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT). *E. coli* isolates were found to show the highest antibiotic resistance to SXT, ampicillin, and gentamicin antibiotics phenotypically.

Table 4. Antibiotic resistance characteristics of gram-positive bacteria isolated from used cosmetic products.

Antibiotics (MIC, µg/mL)	<i>S. aureus</i> (n=6)			<i>S. epidermidis</i> (n=47)			<i>S. hominis</i> (n=17)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Cefoxitin Screening	1	-	5	-	-	47	-	-	17
Benzylpenicillin	3	1	2	26	-	21	12	-	5
Ampicillin	2	-	4	17	3	27	3	-	14
Oxacillin	1	-	5	-	-	47	-	-	17
Gentamicin	3	-	3	5	-	42	13	1	3
Ciprofloxacin	2	-	4	1	-	46	7	-	10
Levofloxacin	1	-	5	9	-	38	1	-	16
Moxifloxacin	1	-	5	1	-	46	-	-	17
Inducible Clindamycin Resistance	1	-	5	-	-	47	-	-	17
Erythromycin	1	-	5	5	-	42	8	-	9
Clindamycin	1	-	5	-	-	47	-	-	17
Q/D*	2	-	4	1	-	46	2	-	15
Linezolid	-	-	6	2	-	45	1	-	16
Vancomycin	-	-	6	-	-	47	-	-	17
Tetracycline	1	-	5	17	2	28	6	-	11
Tigecycline	2	-	4	3	1	44	1	-	16
Nitrofurantoin	-	-	6	7	-	40	-	-	17
Rifampin	-	-	6	11	-	36	-	-	17
SXT*	-	-	6	15	-	31	3	3	11

* Q/D: Quinupristin/ Dalfopristin; SXT: Trimethoprim/ Sulfamethoxazole; R: Resistant; I: Intermediate Susceptible; S: Susceptible; MIC: Minimal Inhibitory Concentration (µg/mL).

It was revealed that 2 *E. coli* isolates showed extended-spectrum β -lactamase resistance. 1 *E. coli* strain was found to have carbapenem resistance. As a result of the phenotypic evaluation, it was identified that *K. pneumoniae* isolates developed the highest resistance to SXT. 5 *K. pneumoniae* isolates were found to have extended-spectrum β -lactamase resistance. Carbapenem resistance was detected in 1 *K. pneumoniae* strain. It was revealed that the highest resistance in *P. aeruginosa* isolates was to SXT.

Table 5. Antibiotic resistance characteristics of gram-negative bacteria isolated from used cosmetic products.

Antibiotics (MIC, µg/mL)	<i>E. coli</i> (n=16)			<i>K. pneumoniae</i> (n=11)			<i>P. aeruginosa</i> (n=4)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Ampicillin	5	-	11	5	-	6	-	-	4
AMC*	3	-	13	5	-	6	-	-	4
P/T*	3	-	13	3	-	8	-	-	4
Cefazolin	2	-	14	5	-	6	-	-	4
Cefuroxime	2	-	14	5	-	6	-	-	4
Cefuroxime Axetil	2	-	14	5	-	6	-	-	4
Cefoxitin	1	-	15	2	-	9	-	-	4
Ceftazidime	2	-	13	5	-	6	-	-	4
Ceftriaxone	3	-	13	5	-	6	1	-	3
Cefepime	1	-	15	1	-	10	1	-	3
Ertapenem	1	-	16	1	-	10	1	-	3
Imipenem	1	-	16	1	-	10	1	-	3
Meropenem	-	-	16	1	-	10	1	-	3
Amikacin	2	-	14	-	-	11	-	-	4
Gentamicin	5	-	11	-	-	11	-	-	4
Ciprofloxacin	3	-	13	5	-	6	1	-	3
Levofloxacin	1	-	15	5	-	6	-	-	4
Tigecycline	1	-	15	-	3	8	-	-	4
Colistin	-	-	16	-	-	11	-	-	4
SXT*	8	-	8	7	-	4	2	-	2

* AMC: Amoxicillin/ Clavulanic Acid; P/T: Piperacillin/ Tazobactam; SXT: Trimethoprim/ Sulfamethoxazole; R: Resistant; I: Intermediate Susceptible; S: Susceptible; MIC: Minimal Inhibitory Concentration (µg/mL).

Only one of the *P. aeruginosa* strains was found to show carbapenem resistance. It was revealed that extended-spectrum β -lactamase resistance existed in none of the *P. aeruginosa* isolates. It was concluded that revealing antibiotic resistance profiles of bacteria isolated from cosmetic products may play an important role in eliminating the risk that may occur on human health.

It was found that the resistance genes of the bacteria isolated after microbiological contamination assessment in used cosmetic products had not been analyzed. The literature was reviewed regarding our region and it was observed that no detailed information on the antibiotic resistance of bacteria isolated from cosmetic products and the analysis of carried gene regions was presented. Only 1 MRSA isolate was isolated in gram-positive bacteria. The analysis of MRSA isolate performed by PCR revealed that it was a *mecA* gene carrier. It was analyzed in terms of *bla_{OXA-48}* and *bla_{IMP}* genes of gram-negative bacteria. 3 *K. pneumoniae* isolates were found to carry the *bla_{OXA-48}* gene (Fig. 1). None of the isolated gram-negative bacteria was found to carry the *bla_{IMP}* gene. It was observed that the bacteria carrying important antibiotic genes could contaminate the cosmetic products that are used. It was determined that the use of contaminated cosmetic products can form a significant potential threat to public health for the emergence of flora bacteria with a resistance gene.

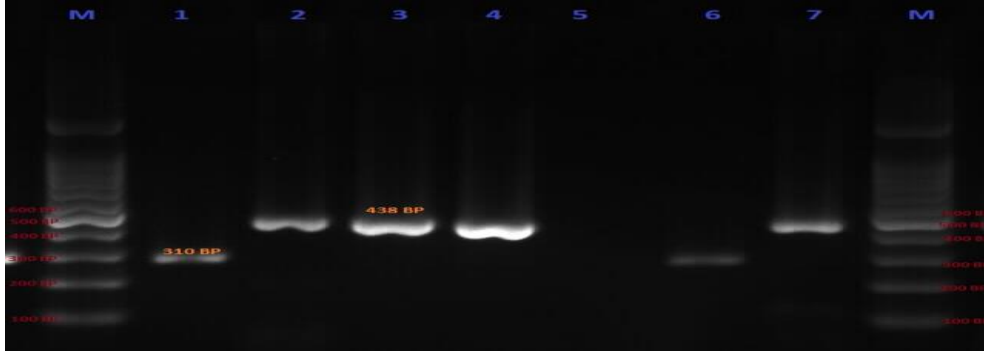


Figure 1. M: 100 bp marker; 1: *mecA* gene positive *S. aureus*; 2,3,4,: *bla_{OXA-48}* genes positive *K. pneumoniae* isolates; 5. Negative control; 6: Positive control of MRSA; 7: Positive control of *bla_{OXA-48}* positive *K. pneumoniae*.

In conclusion, this study revealed that the bacterial profile in contaminated used cosmetic products might vary by personal features and conditions, duration of use, and environmental factors. It was observed that the risk that the bacteria isolated from used cosmetic products could cause significant community-acquired infections. It was found that the antibiotic resistance profiles of the bacterial agents isolated from personal care products varied and they were resistant to methicillin, carbapenem, and extended-spectrum β -lactamase, which could be difficult to treat. For this reason, it is concluded that paying no attention to personal hygiene, duration of use, the environment of the cosmetic product, and using products that do not belong to you may cause serious infections.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception: *Ö.A.*; Design: *Ö.A.*, *K.B.*; Supervision: *Ö.A.*, *K.B.*; Resources: *Ö.A.*, *K.B.*; Materials: *K.B.*; Data collection and/or processing: *Ö.A.*, *K.B.*; Analysis and/or interpretation: *Ö.A.*, *K.B.*; Literature search: *Ö.A.*, *K.B.*; Writing manuscript: *Ö.A.*; Critical review: *Ö.A.*; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Çarıkçı, A., Uçar, F., Yalçın, H. T. (2008). Kozmetik ürünlerde bakteriyel ve fungal kompozisyonun klasik yöntemler ve pcr yöntemi kullanılarak saptanması. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 6(01), 1-16.
2. Çomoğlu, T. (2012). Kozmetikler. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 16, 1 – 8.


3. Bashir, A., Lambert, P. (2019). Microbiological study of used cosmetic products: highlighting possible impact on consumer health. *Journal of Applied Microbiology*, 128(2), 598 – 605.
4. Güven, N., Onurdağ, F. K. (2014). İlaç, kozmetik ve gıda ürünlerinde kullanılan bazı koruyucuların antimikrobiyal ve antibiyofilm etkisinin araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 48(1), 94 – 105.
5. Kıvanç, M. (2012). Kozmetik ürünlerde mikrobiyel kontaminasyon. 2. Kozmetik Kongresi, 17-19 Şubat, Antalya, p. 1 – 15.
6. Abdelaziz, A. A., Ashour, M. S., Hefni, H., el-Tayeb, O. M. (1989). Microbial contamination of cosmetics and personal care items in Egypt eye shadows, mascaras and face creams. *Journal of Clinical Pharmacy Therapeutics*, 14(1), 21 – 28.
7. Ashour, M. S. E., Hefni, H., El-Tayeb, O. M., Abdelaziz, A. A. (1987). Microbial contamination of cosmetics and personal care items in egypt-1-contamination of toothpastes and mouthwashes. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 38, 441 – 435.
8. Özalp, M. (1998). Kozmetik ürünlerde görülen mikrobiyolojik kontaminasyonlar. *Türkiye Klinikleri Kozmetoloji Dergisi*, 1(3), 167 – 176.
9. Brannan, D. K. (1996). Cosmetic preservation. *Cosmetics and Toiletries*, 111, 69 – 83.
10. Fatima, N. (2014). Bacteriological evaluation and comparison of unused branded and non-branded cosmetic products available in Jazan region of Saudi Arabia. *Journal of Microbial World*, 16(1-2), 57 – 67.
11. EUCAST. (2018). Breakpoint tables for interpretation of MIC's and zone diameters. Version 8.0. January 2018. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.
12. Sahebnaşagh, R., Saderi, H., Owlia, P. (2014). The prevalence of resistance to methicillin in staphylococcus aureus strains isolated from patients by PCR method for detection of mecA and nuc genes. *Iranian Journal of Public Health*, 43(1), 84 – 92.
13. Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(1), 119 – 123.
14. Eldesoukey, R. M. M., Alqhtani, B. S., Alqhtani, A. S., Alqhtani, A. H., Alqhtani, A. M. (2016). Comparative microbiological study between traditional and modern cosmetics in Saudi Arabia. *Enzyme Engineering*, 5(2), 1 – 5.
15. Onurdağ, F. K., Özgen, S., Abbasoğlu, D. (2010). Microbiological investigation of used cosmetic samples. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 30(1), 1 – 16.
16. Dadashi, L., Dehghanzadeh, R. (2016). Investigating incidence of bacterial and fungal contamination in shared cosmetic kits available in the women beauty salons. *Health Promotion Perspectives*, 6(3): 159 – 163.
17. Wang, S. M., Liu, C. C., Tseng, H. W., Yang, Y. J., Lin, C. H., Huang, A. H., Wu, Y. H. (1999). *Staphylococcus capitis* bacteremia of very low birth weight premature infants at neonatal

- intensive care units: clinical significance and antimicrobial susceptibility. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, 32(1), 26 – 32.
18. Cone, L. A., Sontz, E. M., Wilson, J. W., Mitruka, S. N. (2005). *Staphylococcus capitis* endocarditis due to a transvenous endocardial pacemaker infection: case report and review of *Staphylococcus capitis* endocarditis. *International Journal of Infectious Diseases*, 9(6), 335 – 339.
 19. Fischetti, V. A., Novick, R. P., Ferretti, J. J., Portnoy, D. A., Rood, J. I. (2006). Gram-positive pathogens, ASM Press, Washington USA, p. 432.
 20. Babalola, M. O., Eze, M. (2015). Microbiological quality and characterization of potential pathogens associated with selected brands of commercial cosmetic products in Nigeria. *British Microbiology Research Journal*, 9(5), 1 – 17.
 21. Jung, I., Kim, J., Yoo, Y., Yoo, J., Park, B., Choi, E. (2019). A pilot study of occupational exposure to pathogenic microorganisms through lip cosmetics among dental hygienists. *Journal of Occupational Health*, 61(4), 297 – 304.
 22. Altan, S. (2010). Master's Thesis. Ağız ve Diş Preparatlarında Farmasötik ve Mikrobiyolojik Kalite Kontrol Çalışmaları. Mersin University, Mersin, Turkey.
 23. Lundov, M. D., Zachariae, C. (2008). Recalls of microbiologically contaminated cosmetics in EU from 2005 to May 2008. *International Journal of Cosmetic Science*, 30(6), 471 – 474.
 24. Behravan, J., Bazzaz, F., Malaekheh, P. (2005). Survey of bacteriological contamination of cosmetic creams in Iran (2000). *International Journal of Dermatology*, 44(6), 482 – 485.
 25. Janetos, T. M., Akintilo, L., XU, S. (2018). Overview of high-risk food and drug administration recalls for cosmetics and personal care products from 2002 to 2016. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 18(5). doi: 10.1111/jocd.12824. Online ahead of print.
 26. Haftbaradaran, B., Abedi, D., Jalali, M., Bagherinejad, M. R. (2014). Microbial quality survey of sunscreen products in Iranian market. *Advanced Biomedical Research*, 3, 1 – 14.
 27. Templeton, K., Gripentrog, E., Hellwig, T. (2012). Shining the light on sunscreen. *US Pharmacist*, 37(4), 36 – 39.
 28. Jemec, G. B., Renneberg, J., Wulf, H. C. (1997). Microbiology of sunscreens in use. *Dermatosen in Beruf und Umwelt*, 45(6), 275 – 277.
 29. Baird, R. M., Bloomfield, S. F. (1996). Microbial quality assurance in cosmetics, toiletries and non-sterile pharmaceuticals, Taylor and Francis Groups, CRC Press, London, p. 272.
 30. Kabara, J. J., Orth, D. (1997). Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs: principles and practices, CRC Press, New York, p. 287.
 31. Wedderburn, D. L. (1964). Preservation of emulsions against microbial attack. *Advances in Pharmaceutical Sciences*, 1, 195 – 268.



İNFAÑTİL KOLİKLİ BİR BEBEKTE ELMA YAĞI NEDENLİ UYKUYA EĞİLİM

APPLE OIL-INDUCED SLEEP TENDENCY IN AN INFANTILE COLIC BABY

Ayşegül BÜKÜLMEZ¹ , Ayşegül KÖROĞLU^{2,3} *  Zeynep YEŞİLDAĞ¹ ,
Gülmira ÖZEK⁴ 

¹Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, 03200, Afyonkarahisar, Türkiye

²Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, 03200, Afyonkarahisar, Türkiye

³Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, 06560, Ankara, Türkiye

⁴Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 26470, Eskişehir, Türkiye

ÖZ

Amaç: İnfantil kolik, aile ve hekim için oldukça kaygı verici 4 aylıktan küçük bebeklerde sık olarak acile başvuru nedeni olan ve etiyolojisi net bilinmeyen ağlama krizleridir. Yoğun ağlama krizleri sırasında çaresiz kalan aileler, çevredekilerin de etkisi ile farklı tedavi yöntemleri arama eğilimindedirler. 28 yaşındaki annenin 1. gebeliğinden normal spontan vaginal yol ile 39 gebelik haftasında doğan iki aylık erkek bebeğin, son 24 saattir uyandırılmaması şikayeti, acil servise başvuru nedenidir. Acil servise başvuru öyküsünde ailenin, bebeğin yoğun ağlama nöbetleri nedeniyle eczaneden alınan farklı farmakolojik ürünleri ardı ardına denediği, ancak bebeğin şikayetlerinin devam etmesi nedeniyle, çevredekilerinin de önerisi ile “elma yağı” adı ile satın aldıkları ve içeriğini bilmedikleri bir ürünü bebeğin göbek bölgesine masaj yoluyla uygulandığı ve sonrasında bebeğin ağlamalarının azaldığı ve uykuya meyilli olduğu bilgisi yer almıştır. Hastanedeki tedavi sırasında bebeğin sadece uyarılınca uyandığının belirlenmesi sonucu aileden kullandıkları ürün istenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Piyasadan satın alınan ve bebeğe masaj yoluyla uygulanan “elma yağı” adı ile satışı sunulmuş ürünün, GC-FID ve GC/MS yöntemleri ile içerik analizi yapılmıştır. Uçucu bileşiklerin teşhisi için çeşitli bilimsel veri kütüphaneleri kullanılmıştır.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Ayşegül Köroğlu
e-posta / e-mail: aguvenc@ankara.edu.tr, Tel. / Phone: +904324445065

Sonuç ve Tartışma: *Bu çalışma, son yıllarda doğala yönelme kavramının bilinçsiz ellerde geri dönüşümü olmayacak kadar olumsuz sonuçlara neden olabileceğini göstermekte ve aynı zamanda ilaçlar ve tıbbi doğal ürünler alanında yetkin olan eczacılık mesleğinin önemini göz önüne sermektedir.*

Anahtar Kelimeler: *Elma yağı, gaz kromatografisi, infantil kolik, izoamil asetat, Salvia fruticosa*

ABSTRACT

Objective: *Infantile colic is crying crises that a cause of frequently emergency application in infants younger than 4 months and whose aetiology is unknown. Families who are desperate during intense crying crises tend to seek different treatment methods with the influence of those around. The complaint of not waking up for the last 24 hours of a two-month-old male baby born at 39 weeks of gestation with normal spontaneous vaginal delivery from the first pregnancy of a 28-year-old mother is the reason for admitting to the emergency department. In the history of applying to the emergency department, the family tried different pharmacological products purchased from the pharmacy one after another due to the intense crying attacks of the baby, but the complaints of the baby continued, the family bought a product called "apple oil" and applied the product that they did not know the content to the baby by massaging the oil to the umbilicus area with the suggestion of the people around. It was reported that the baby's cries were reduced and he was susceptible to sleep. As a result of the detection that the baby woke only when stimulated during the hospital treatment, the product they used was requested from the family.*

Material and Method: *The content analysis of the product, which was bought from the market and put up for sale under the name of "apple oil" applied to the baby by massaging, was performed using GC-FID and GC/MS methods. Various scientific data libraries have been used to identify volatile compounds.*

Result and Discussion: *This study shows that the concept of turning to nature in recent years can cause irreversible negative consequences in unconscious hands, and also highlights the importance of the pharmacy profession, which is highly competent in the field of medicines and medicinal natural products.*

Keywords: *Apple oil, gas chromatography, infantile colic, izoamyl acetate, Salvia fruticosa*

GİRİŞ

Tamamlayıcı tıp, modern tıbbı yardımcı olarak kullanılan tedavi yöntemlerini tanımlarken; alternatif tıp, modern tıbbın yerini alan tedavi yöntemlerini içermektedir. Bu iki terim birlikte tamamlayıcı ve alternatif tıp başlığı altında kullanılmaktadır [1]. Geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamalarının kökeni yaklaşık 5000 yıllık geçmişe sahip olan Geleneksel Çin Tıbbı (GÇT) ve Geleneksel Hint Tıbbı (Ayur-veda)'na dayanmaktadır. Eski çağlarda geleneksel iyileştiriciler ve şamanların görev yaptığı toplumlarda, bitkisel tedavilerin kullanımı tıbbın bir parçası olarak karşımıza çıkmaktadır. 1998 yılında Birleşik Devletlerde Ulusal Sağlık Enstitüsüne (NIH) bağlı Ulusal Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp Merkezi (NCCAM) kurulmuştur. Bu merkezin amacı, tamamlayıcı ve alternatif tıp (CAM) uygulamalarının güvenilirlik ve etkinliğini incelemek, etkinliği bilimsel olarak kanıtlanmış uygulamaların geleneksel tedavilere katılımını sağlamaktır. Geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamalarının çocuklarda kullanımı sıklıkla görülmektedir. Yurt dışında yapılan çalışma sonuçlarına göre, hastaneye yatırılmış çocukların yanı sıra ayaktan tedavi alan çocuklarda da geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamalarının kullanımı % 1.8 ile % 84 arasında değişmektedir [2-5]. Avrupa ülkelerinde yapılan çalışmaları derleyen bir makalede, çocuklarda, bir yıl içinde geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamalarının uygulanma oranı % 56 olarak saptanmıştır [6]. Ülkemizde, yapılan çalışmalarda ise, çocuklarda geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamalarının uygulanma oranları % 56,5 ile % 87 arasında değişmektedir [7-11]. Çocukların tedavisinde geleneksel ve tamamlayıcı tıp

uygulamalarının kullanımının yaygınlaşması ile birlikte bu tür tedavilere bağlı yan etkilerin görülme oranında da artış olmuştur [12]. Dünya Sağlık Örgütü'nün 1968-1997 yılları arasında 55 ülke üzerinde yaptığı bir çalışmada, bitkisel tedaviye bağlı binlerce yan etki ve 100'ün üzerinde ölüm vakası bildirilmiştir [13-16].

Olguda, yoğun ağlama krizlerini gidermek için iki aylık erkek bebeğe masaj yolu ile uygulanan maddenin "elma yağı" adı ile satın alındığı öğrenilmiştir. Bu nedenle öncelikli olarak kullanılan ürünün bitkisel kökenli olduğu düşünülmüştür. Yöre halkı, bitkinin yapraklarında ve dallarında büyüyen mazıların (Sage apple galls) küçük elmalara benzemesi nedeniyle adaçayı yağına "elma yağı" adını verir. Elma yağı ülkemizde, Türk adaçayı (Anadolu adaçayı, üç loblu) adı ile tanınan *Salvia fruticosa* Mill. (Sin. *Salvia triloba* L.f.; Lamiaceae, Ballıbabagiller)'nin yapraklı dallarından buhar distilasyonu ile elde edilen uçucu yağ olarak bilinir [17,18]. *S. fruticosa* tıbbi değeri nedeniyle Türk Farmakopesi 2017 ve Avrupa Farmakopesi'nde kayıtlı olan bir bitkidir [18,19]. Arkeolojik verilere göre adaçayının, Knossos, Frecoes Evi'ndeki "mavi kuş freskinde" resmedilmiş olması nedeniyle muhtemelen MÖ 1400'lerden beri kullanıldığı düşünülmektedir [20]. Bazı *Salvia* türleri (*Salvia officinalis* L., *S. fruticosa*, *S. lavandulaefolia* Vahl., *S. verbenaca* L. ve *S. sclarea* L.) şifalı bitkiler pazarında önemli ticari değere sahiptir. *S. tomentosa* Miller, gelişme potansiyeli olan başka bir *Salvia* türüdür. *S. officinalis* birçok ülkede, *S. sclarea* ise Avrupa ve Kuzey Amerika'da yetiştirilirken, *S. fruticosa* yağı, yabancı bitkilerden ve kültüre alınmış bitkilerden elde edilir. Çoğu *Salvia* türü (% 69), uçucu yağ açısından orta derecede zengindir (% 0.1-1.0). Ticari türlerden oluşan dokuz takson (% 14) >% 1 uçucu yağ içermektedir. Türkiye *Salvia* türleri Başer (2002) tarafından uçucu yağlarının ana bileşenlerine göre sınıflandırılmıştır. Ticari *Salvia* türleri CiCa (1,8-sineol / kâfur) grubu, *S. fruticosa*; pinen (α/β) grubu, *S. tomentosa*; tuyon (α/β) grubu, *S. officinalis* ve *S. pomifera* (sinonim *S. calycina*) gibi gruplara ayrılmıştır [21].

Adaçayı yağı üretiminin ve ihracatının gerçek durumu (özellikle Akdeniz ülkelerinde) Başer tarafından incelenmiş ve yayınlanmıştır. Türkiye'de yılda yaklaşık 500 kg *S. triloba* (*S. fruticosa*) yaprak yağı üretilmektedir. 1996 yılında değeri 1,5 milyon ABD Dolarının üzerinde 600 ton adaçayı yaprağı ihraç edilmiştir. Adaçayı yağı, Türkiye'nin Manisa ve Alanya illerinde bulunan *S. fruticosa*'dan (yabani) üretilmektedir [22].

Etnofarmakolojik araştırmalar *Salvia fruticosa*'nın halk arasında geniş bir kullanımının olduğunu ortaya koymuştur. İshal [23], soğuk algınlığı ve karın ağrısı [24], antiseptik, dispepsi, bademcik iltihabı [25,26] başlıca kullanım alanlarıdır. *S. fruticosa*'dan elde edilen uçucu yağların ve ekstrelerin farmakolojik özellikleri kapsamında, antiinflamatuvar [27], antioksidan [28,29], antimikrobiyal [30], antifungal [31], antikanser [32], antiasetilkolinesteraz [33], antilipaz [34] etkilere sahip olduğu belirlenmiştir.

Adaçayı uçucu bileşenlerinin kimyasal yapıları üzerinde pekçok çalışma yapılmıştır. Türkiye'de üç farklı lokaliteden toplanan (Muğla-Torba, Marmaris-Bayır köyü, Tekirdağ/Gaziköy-Şarköy) adaçayı

mazısı (elma yağı) uçucu yağlarının kimyasal bileşimi incelenmiştir. Üç numunede, Başer tarafından [21] CiCa grubu olarak belirlenen *S. fruticosa*'nın uçucu yağının ana bileşenleri olan 1,8-sineol (% 1.7 - % 13.1) ve kafur oranlarında (% 3.2 den % 21.3) büyük farklılıklar tespit edilmiştir. Seskiterpen grubu β -karyofillen (% 7.9) ve viridiflorol (% 8.6) ile temsil edilmiştir. Bununla birlikte, çalışılan elma yağları önemli miktarda diterpen manool ile de karakterize (% 5.2-17.2) edilmiştir [35]. Yukarıda bahsedilen bilgiler ışığında *Salvia* kaynaklı elma yağının çok spesifik bir kimyasal içeriğe sahip olduğu anlaşılmaktadır. Günümüzde, piyasada elma yağı adıyla çeşitli ürünler satılmaktadır. Ancak, bu ürünlerin çoğu *Salvia* türlerinden distile edilerek elde edilen “elma yağı” değildir. Bunun yanı sıra, bu ürünlerin hiçbirinin gerçek elma (*Malus domestica* Borkh.; Rosaceae, Gülgiller) ile de ilişkisi bulunmamaktadır, çünkü elma meyvesinden uçucu yağ elde edilmemektedir. Buna rağmen elmaya benzemek için ürünlerin çoğu elma esansı ile kokulandırılmakta ve çeşitli amaçla kullanılmaktadır.

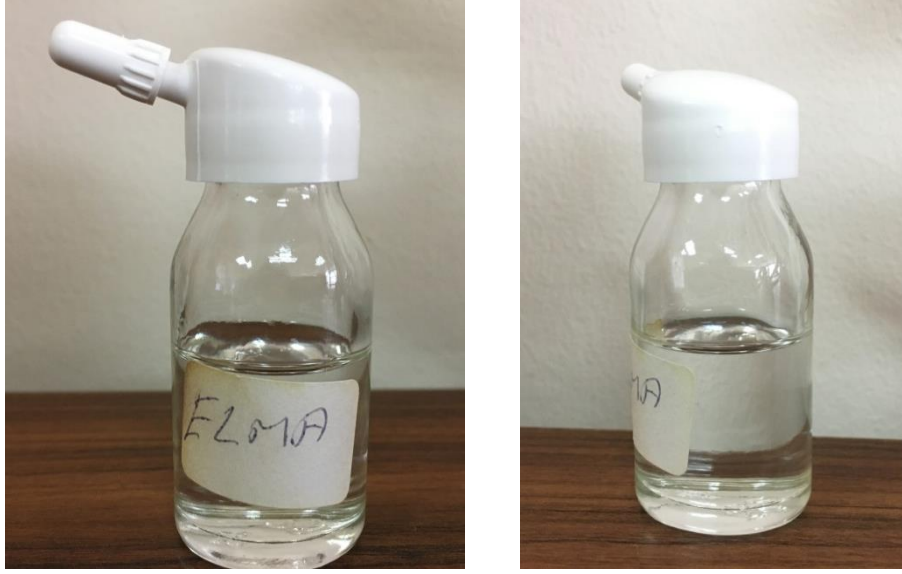
Daha önce elma yağı adıyla satın alınmış ürünlerin kullanılması sonucunda değişik zamanlarda meydana gelen vakalar rapor edilmiştir [36,37]. Ancak, bu vakalarda bitki adı verilmiş olsa da yağın elde edildiği doğru kaynak ve yağın kimyasal bileşimi hakkında herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır.

Yirmi sekiz yaşındaki annenin 1. gebeliğinden normal spontan vaginal yol ile 39 gebelik haftasında doğan iki aylık erkek bebeğin, son 24 saattir uyandırılmama şikayeti ile ailesi refakatinde acil servise başvurusu yapılmıştır. Öyküsünden ailesinin bebeğin yoğun ağlama nöbetleri olması nedeniyle eczaneden aldıkları farklı farmakolojik ürünleri ardı ardına denedikleri, ancak yine de bebeğin ağlama krizlerinin devam ettiği öğrenilmiştir. Ailenin çevredekilerin de önerisi ile piyasadan “elma yağı” adı ile satın aldıkları ve içeriğini bilmedikleri bir ürünü, göbek bölgesine (umblikus) masaj yaparak uyguladıktan sonra bebeğin ağlamalarının azaldığı bilgisine ulaşılmıştır. Ailenin ve bebeğin soy geçmişinde olumsuz bir özellik belirlenmemiştir. Bebeğin fizik muayenesinde uykuya meyilli olduğu ve sadece uyarılınca uyandığı görülmüştür. Umblikus çevresinde hiperemi tespit edilmiştir. Diğer sistem muayenelerinde herhangi bir özellik belirlenmemiştir. Görüntüleme yöntemlerinde patoloji saptanmamış, laboratuvar tahlillerinde kan gazında hafif laktik asit yüksekliği dışında belirgin bir anomali tespit edilmemiştir. Hastanede vücudu yıkanarak sıvı tedavisi verilen bebek, yatışının 48. saatinde komplikasyonsuz aktif canlı bir şekilde ayaktan kontrole gelmek üzere taburcu edilmiştir.

Bu çalışmada, piyasadan satın alınarak iki aylık erkek bebeğin göbek (umblicus) bölgesine masaj yoluyla uygulanan bitkisel içerikli olduğu düşünülen yağ, Gaz Kromatografisi ve Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi ile incelenmiş ve yapılan analiz sonuçları bilimsel veriler doğrultusunda irdelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma konusu olan numune, “elma yağı” adı ile Burdur Merkez’den satın alınmıştır (**Şekil 1**).



Şekil 1. Elma yağı adı ile piyasadan satın alınan ürün.

Gaz-Kromatografisi ve Gaz-Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-FID ve GC/MS) Analizi

Uçucu bileşen kimyasal yapısı GC-FID ve GC/MS yöntemleriyle aydınlatıldı. Her iki analiz için de HP-Innowax FSC kolonu (60 m × 0.25 µm, 0.25 µm film kalınlığı, Agilent, Walt & Jennings Scientific, Wilmington, DE, USA) ve taşıyıcı gaz olarak helyum gazı kullanıldı. Fırın 60 °C'de 10 dakika kaldıktan sonra 220 °C'ye dakikada 4 °C ile çıkıp, 220 °C'de 10 dakika kalıp, 240 °C'ye dakikada 1 °C ile çıkmak üzere programlandı. Split oranı 40:1 olarak seçildi. Alev iyonlaşma detektörü ve enjektör 250 °C'de tutuldu. Kütle spektrumu 70 eV, kütle menzili 35-450 m/z seçildi. Maddelerin tanımlanmasında tutunma zamanları ve kütle spektrumları standartlara ve literatür bilgilerine paralel olarak değerlendirildi.

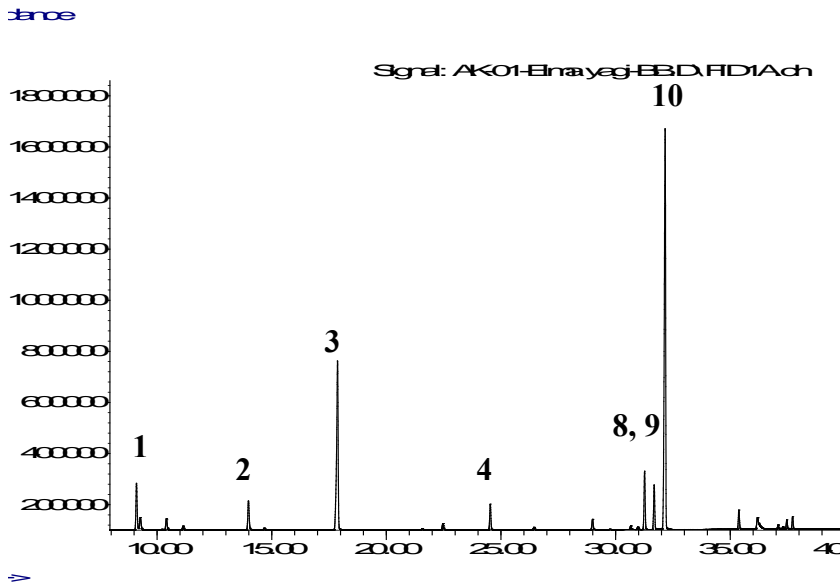
Uçucu Bileşiklerin Teşhisi

Uçucu bileşiklerin teşhisi için Wiley GC/MS Library (Wiley, New York, NY, USA), MassFinder software 4.0 (Dr. Hochmuth Scientific Consulting, Hamburg), Adams Library, NIST Library ve Başer Library of Essential Oil Constituents kaynak olarak kullanıldı. Madde miktarlarının belirlenmesinde alev iyonlaşma dedektöründen (FID) elde edilen piklerin yüzde alanları kullanıldı.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Tıbbi tedavide hastaya bir tedavi ya da girişim planlandığında tedavi/girişimin yararı kadar zararları da göz önüne alınmaktadır. Bununla birlikte geleneksel ve tamamlayıcı tedavilerde yarar-zarar değerlendirmesi bu alanda yapılan çalışmaların kısıtlı, bilginin eksik olması nedeni ile zordur [12]. Çocuklarda ilaç ve kimyasal maddelerin emilimi, yıkımı, metabolizması ve atılımı yetişkinlerden

farklıdır. Bu gruptakilerin, karaciğer ve böbrek fonksiyonları fizyolojik olarak immatür olduğu için ilaç ya da kimyasal maddelerden etkilenme olasılığı da erişkinlere göre daha fazladır. Bu nedenle çocuklarda yan etkiler daha şiddetli ve ölümcül olabilir. Geleneksel ve tamamlayıcı tedavilere bağlı görülen yan etkiler, doğrudan ve dolaylı olmak üzere ikiye ayrılır. Doğrudan etkileri kullanılan tedavi şekline göre değişmektedir. Örneğin en çok bitkisel terapilere bağlı yan etkiler görülmektedir. Bitkisel ürünlerin güvenliği; içerdiği kimyasal maddelerin karışımı, içeriğin diğer bitki ve ilaçlar ile etkileşim düzeyi, bitkinin hazırlanması esnasındaki kontaminasyonu, içine yabancı cisim karışımı ve toksisite düzeyi ile ilişkilidir. Bitkisel ürünlerde, bitkinin aktif bileşenleri ve metabolitleri, farmakokinetik özellikleri, toksikolojisi ve antidotu, yan etkilerinin görülüş sıklığı, diğer bitki veya ilaçlar ile etkileşimi, özel hasta gruplarında kullanımı konusunda bilgi eksiklikleri vardır. Bu nedenle de yan etkilere sık rastlanır. Bitkisel tedavide duyarlılık (sensitivite), organ toksisitesi ve farmakolojik ilaçlar ile etkileşim gibi yan etkiler sıklıkla görülmektedir [38]. Geleneksel ve tamamlayıcı tedavi uygulamalarının tıbbi tedaviyi geciktirme, tıbbi tedaviyi bırakma ya da reddetme, gereksiz harcamalar, başarısızlık ve suçluluk duygusu gibi dolaylı yan etkileri de vardır [39]. Geleneksel ve tamamlayıcı tedavilerin çoğu anne-babalar tarafından başlatılmaktadır. Çalışmalarda ebeveynlerin en az % 50'sinin geleneksel ve tamamlayıcı tedavi kullandıklarını çocuklarının doktor ve hemşiresinden sakladıkları belirlenmiştir [40-43].



Şekil 2. Elma yağı adı ile satışı yapılan ürünün Gaz Kromatografisi ile elde edilen kromatogramı.

Numune, piyasadan el yazısı ile "elma" yazılı etiket bilgisine sahip, kendinden plastik damlalıklı, şeffaf cam şişe içinde, Burdur ilinden satın alınmıştır. Ürünün organoleptik kontrolünde, karakteristik yeşil elma kokusunda, ince yağ kıvamında ve renksiz olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1). Buna rağmen *Salvia fruticosa*'dan elde edilen uçucu yağ: soluk sarı renkte, otsu, keskin ve baharatlı

kokuda ve ince kıvamda bir yağdır [44]. Piyasadan satın alınarak 2 aylık bebekte uygulanan yağın organoleptik özellikleri, *Salvia fruticosa*'dan elde edilen yağın organoleptik özellikleri ile uyuşmamaktadır.

Ailenin 2 aylık erkek bebekte infantil kolik için kullandığı ürün üzerinde gerçekleştirilen GC-FID ve GC/MS analizinde ürünün, bitkisel bir isim taşımaya rağmen tamamen sentetik içerikli maddelerden oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 2; Tablo 1).

Tablo 1. Elma yağı adı ile satışı yapılan ürünün belirlenen kimyasal bileşimi.

No	RTİ*	Bileşik	%
1	942	2,4-Dimetil-1,3-dioksolan (isomerler karışımı)	1,4
2	1045	Etil butirat	3,5
3	1136	Izoamil asetat	23,5
4	1232	(E)-2-Hekzenal	0,8
5	1282	Hekzil asetat	2,7
6	1391	(Z)-3-Hekzenol	1,2
7	1432	(E)-4-Metil-2-(pent-1-enil)-1,3-dioksolan	0,4
8	1450	2-Hekzenal propilen glikol asetal 2	5,9
9	1462	2-Hekzenal propilen glikol asetal 2 izomer	4,5
10	1475	2-Propenil butanoat (= <i>Allyl heptanoat</i>)	48,7
11	1574	Mentil asetat	1,9
12	1596	1,2-Propanediol	2,5
13	1626	Etil 2,4-dimetil-1,3-dioksolan-2-asetat	0,4
14	1639	Etil 2-(2,4-dimetildioksolan) asetat (= <i>Fraistone</i>)	0,9
15	1648	3-Metilbutoksi-2-propenil asetat	1,2
		Toplam	99,5

* RTİ: Relatif Tutunma İndisi; % bileşiklerin bağıl bolluk değerleri GC-FID integrasyon üzerinden belirlenmiştir.

Geleneksel ve tamamlayıcı tedavi yöntemleri, sıklıkla doğal olmaları nedeniyle güvenli tedavi yöntemleri olarak bilindikleri ve pazarlandıkları için yan etkileri ve zararlı etkileri olabileceği göz ardı edilmektedir. Oysa başta tedavide gecikme, hepatotoksisite, bulantı, kusma, baş ağrısı, dermatit, uyku bozuklukları olmak üzere bildirilen pek çok yan etkileri bilinmektedir [45,46].

Tamamen doğal olduğu düşünülen ve bu şekilde alınıp 2 aylık erkek bebeğin göbek bölgesine masaj yoluyla uygulanan ürünün, GC-FID ve GC/MS ile yapılan kimyasal analizi sonucunda bitkisel bir kaynaktan elde edilmediği tespit edilmiştir. GC-FID ve GC/MS incelemesi ile tamamen kimyasal

içeriğe sahip olduğu belirlenen üründe % 48,7 oranında bulunan 2-propenil butanoat (= allyl heptanoat), Avrupa Parlamentosu ve Konsey Tüzüğü (EC) (No 2232/96) tarafından gıda tatlandırıcısı olarak kabul edilen kimyasal bileşiklerden birisidir [47,48]. İzoamil asetat, asetik asit ve izoamil alkolden üretilen ticari açıdan önemli bir çözücüdür ve geleneksel olarak muz aroması vermek için kullanılır. Bu bileşik doğal olarak muzda bulunur, ancak aynı zamanda bir fermantasyon yan ürünü olarak da bulunabilir. İzoamil asetat ayrıca bal arılarının iğnesinden de salgılanır ve diğer arıları çekmeye ve saldırmaya teşvik etme özelliğinde bir kimyasal bileşiktir. Söz konusu “elma yağı” adı altında kullanılan ürünün bileşiminde varlığı tespit edilen ikinci önemli ana kimyasal madde olan izoamil asetatı solunmak burnu, boğazı ve akciğerleri tahriş edebilir. Yüksek konsantrasyonlarda izoamil asetata maruz kalmak baş ağrısı, uyuşukluk, baş dönmesi, yorgunluk ve bayılmaya neden olabilir. Uzun süreli veya tekrarlanan temas, cildin kurummasına ve çatlamasına neden olabilir [49]. ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'ne (CDC) göre [50], izoamil asetat solunduğunda mukozal yüzeyleri tahriş edebilir ve 50-400 ppm'nin üzerindeki konsantrasyonlarda cilt hasarına ve 1000 ppm'in [51] üzerindeki konsantrasyonlarda ise yorgunluk, solunum tahrişi ve dispneye neden olabilir.

“Elma yağı” adı ile piyasadan satın alınıp 2 aylık erkek bebeğe masaj yoluyla uygulanan ve kimyasal içerik çalışması sonucunda bitkisel bir bileşime sahip olmadığı tespit edilen ürünün, piyasada satışa sunulmuş olması aslında bitkisel ürünlerin suistimale açık bir konu olduğunu göstermiştir. Tedavi amacıyla kullanılacak bitkisel ürünlerin kalite, etkinlik ve güvenlik açısından ilaç niteliğinde olduğu bilinmeli ve bu doğrultuda değerlendirilmeleri gerekmektedir. Bu nedenle tıbbi bitkisel ürünlerin kaynağı belli olmayan materyalden, olumsuz ortam ve koşullarda elde edilmeleri kalite, etkinlik ve güvenlik açısından şüphe taşımaktadır. Satın alınan ürün ilaç niteliğinde değildir ve ilaç ciddiyetinden uzaktır (Şekil 1). Bitmiş, etiketlenmiş son ürün niteliğinden yoksundur. Etiket üzerinde ürün adı el yazısı ile yazılmış ve başka hiçbir bilgiye yer verilmemiştir. Tedavi amacıyla kullanılacak tıbbi bitkisel ürün ya da ürünlerin mutlaka standardizasyonunun yapılmış olması bu standardizasyonun da botanik kaynaktan başlaması gerektiği unutulmamalıdır. İlaç niteliği taşıyan bütün doğal ve kimyasal maddelerin standardizasyonunu sağlamak için yasal değeri olan Farmakopeler yayınlanmaktadır. Bahsi geçen “elma yağı” adı ile satın alınan ürün hiçbir şekilde farmakope standartına uygun değildir [18, 19]. Çalışma, daha önce yaptığımız çalışmalarda da değişik boyutlarını göstermeye çalıştığımız gibi [52, 53, 54], sağlığı sürdürmek ve tedavi etmek için kullanılan bu tip eczane dışında halka sunulan ürünlerin, mutlaka yasal takiplerinin yapılması gerekliliğini ortaya koyması açısından önemlidir. Bitkisel olduğu düşünülerek kullanılan ve olumsuz sonuçlara neden olabilecek eczane dışında satışı yapılan ürünler, ilgili kurumlar tarafından daha dikkatle denetlenmeli ve özellikle 2 yaş altı çocuklarda bu tip ürünlerin kullanılmasından kaçınılmalıdır.

İnfanıl kolik tedavisinde öncelikle nonfarmakolojik tedavide, aile desteği ve kullanılacak ürün güvenilirliğinin iyi yapılandırılması önemlidir. Aksi takdirde aileler çare arayışına girip ciddi ve hayati

önemi olabilecek sonuçları olan durumlar ile karşılaşabileceklerdir. Uyandırılmama şikayeti ile başvuran bebeklerde son yıllarda giderek artan oranda içeriği tam olarak bilinmeyen ürünlerin kullanımı, ilk başvuruda alınacak öyküde ayrıntılı sorgulanmalıdır. Bu konuda özellikle 2 yaşından küçük çocuklarda hekim ve ailenin dikkatli olması önerilmektedir. Sağlık profesyonellerinin infantil kolikliği olan bebeğe sahip aileleri, içeriği bilinmeyen ürünleri kullanmamaları konusunda uyarmaları ve bitkisel tedavi konusunda bilgi birikimine sahip olmaları oldukça önemlidir. Bu çalışma, tıbbi bitkilerle yapılacak tedavinin bilinçsiz ellere bırakılmayacak kadar değerli ve önemli bir konu olduğunu ortaya çıkarması açısından bilimsel değere sahiptir.

YAZAR KATKILARI

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

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. NIH Panel on Definition and Description. (1997). Defining and describing complementary and alternative medicine. *Alternative Therapies Health Medicine* 3, 49-57.
2. Davis, M.P., Darden, P.M. (2003). Use of complementary and alternative medicine by children in the United States. *The Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 157, 393-6. <https://doi.org/10.1001/archpedi.157.4.393>
3. Hanson, E., Kalish, L.A., Bunce, E., Curtis, C., McDaniel, S., Ware, J., Petry, J. (2007). Use of complementary and alternative medicine among children diagnosed with autism spectrum disorder. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 37, 628-36.
4. Lim, A., Cranswick, N., Skull, S., South, M. (2005) Survey of complementary and alternative medicine use at a tertiary children's hospital. *The Journal of Paediatrics and Child Health*, 41, 424-7. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1754.2005.00659.x>
5. Kelly, K.M., Jacobson, J.S., Kennedy, D.D., Braudt, S.M., Mallick, M., Weiner, M.A. (2000). Use of unconventional therapies by children with cancer at an urban medical center. *Journal*

- Pediatric Hematology Oncology*, 22, 412-6. <https://doi.org/10.1097/00043426-200009000-00005>
6. Zuzak, T.J., Boňková, J., Careddu, D., Garami, M., Hadjipanayis, A., Jazbec, J., Merrick, J., Miller, J., Öztürk, C., Persson, I.A.L., Petrova, G., Peiro, P.S., Schraub, S., Simões-Wüst, A.P., Steinsbekk, A., Stockert, K., Stoimenova, A., Styczynski, J., Tzenova-Savova, A., Ventegodt, S., Vlieger, A.M., Langler, A., (2013). Use of complementary and alternative medicine by children in Europe: published data and expert perspectives. *Complementary Therapies in Medicine*, 21, 34-47. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2012.01.001>
 7. Öztürk, C., Karayağız, G. (2008). Exploration of the use of complementary and alternative medicine among Turkish children. *Journal Clinical Nursing*, 17, 2558-64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2702.2008.02329.x>
 8. Giray Bozkaya, Ö., Akgün, İ., Birgi, E., Çinkoğlu, A., Gög, K., Karadeniz, D. (2008). Anne babaların çocuklarında uyguladıkları alternatif tıp yöntemleri. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 22, 129-35.
 9. Taşar, M.A., Potur, E.D., Kara, N., Bostancı, İ., Dallar, Y. (2011). Düşük gelir düzeyine sahip ailelerin çocuklarına tamamlayıcı veya alternatif tıp uygulamaları: Ankara hastanesi verileri. *Türkiye Çocuk Hastanesi Dergisi*, 5, 81-8.
 10. Araz, N., Bülbül, S. (2011). Use of complementary and alternative medicine in a pediatric population in southern Turkey. *Clinical Investigative Medicine*, 34, 21-9. <https://doi.org/10.25011/cim.v34i1.14909>
 11. Tuncel, T., Şen, V., Kelekçi, S., Karabel, M., Şahin, C., Uluca, Ü., Karabel, D., Haspolat Y.K., (2014). Kronik hastalığı olmayan çocuklarda tamamlayıcı ve alternatif tıp kullanımı. *Türk Pediatri Arşivi*, 49, 148-53. <https://doi.org/10.5152/tpa.2014.1498>
 12. Barnes, J. (2003). Quality, efficacy and safety of complementary medicines: fashions, facts and the future. Part II: Efficacy and safety. *Journal Clinical Pharmacology*, 55, 331-340.
 13. Pearce, A., Simpson, N. (1998). A paediatrician's guide to complementary medicine. *Current Paediatrics* 8, 62-67.
 14. Chan, T.Y. (1994). The prevalence use and harmful potential of some Chinese herbal medicines in babies and children. *Veterinary Human Toxicology*, 36, 238-240.
 15. Ang-Lee, M.K., Moss, J., Yuan, C.S. (2001). Herbal medicines and perioperative care. *The Journal of the American Medical Association*, 286, 208-216.
 16. Gardiner, P., Kemper, K.J. (2000). Herbs in pediatric and adolescent medicine. *Pediatrics Review*, 21, 44-57.
 17. Baytop, T. (1999). Türkiye'de Bitkiler İle Tedavi (geçmişte ve bugün). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
 18. Türk Farmakopesi 2017. (2018). T.C. Sağlık bakanlığı, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu. Genel Monograflar, Cilt III A-G, Artı 6 Reklam Mattbaa Ltd. Şti. Ankara.
 19. European Pharmacopoeia, Council of Europe. (2013). 10th ed., Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare.

20. Rivera, D., Obon, C., Cano, F. (1994). The botany, history and traditional uses of three-lobed sage (*Salvia fruticosa* Miller) (Labiatae), *Economic Botany*, 48, 190-195.
21. Başer, K.H.C. (2002). Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey. *Pure Applied Chemistry*, 74(4), 527-545.
22. Başer, K.H.C. (2000). "Sage. The Genus *Salvia*" In: Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles. edited by Spiridon E.Kintzios. Published by license under the Harwood Academic Publishers imprint, part of the Gordon and Breach Publishing Group. Harwood Academic Publishers, Printed in Singapore.
23. Jaradat, N.A., Ayesh, O.I., Anderson, C. (2016). Ethnopharmacological survey about medicinal plants utilized by herbalists and traditional practitioner healers for treatments of diarrhea in the West Bank/Palestine, *Journal Ethnopharmacology*, 182, 57-66.
24. Gali-Muhtasib, H., Hilan, C., Khater C. (2000). Traditional uses of *Salvia libanotica* (East Mediterranean sage) and the effects of its essential oils, *Journal Ethnopharmacology*, 71, 513-520.
25. Hatipoglu, S. D., Zorlu, N., Dirmenci, T., Goren, A.C., Ozturk, T., Topcu, G. (2016). Determination of volatile organic compounds in forty five *Salvia* Species by thermal desorption-GC-MS technique, *Records Natural Products*, 10, 659-700.
26. Uysal, I., Gucel, S., Tutenocakli, T., Ozturk, M. (2012). Studies on the medicinal plants of Ayvacik-Çanakkale in Turkey, *Pakistan Journal Botany*, 44, 239-244.
27. Boukhary, R., Raafat, K., Ghoneim, A.I., Aboul-Ela, M., El-Lakany, A. (2016). Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Salvia fruticosa*: An HPLC determination of phenolic contents, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 7178105, 1-6.
28. Sarıçoban, C., Özcan, M., (2004). Antioxidative activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and sage (*Salvia fruticosa* L.) essential oils in chicken fat. *Journal Essential Oil Bearing Plants*, 7, 91-95.
29. Vergine, M., Nicoli, F., Negro, C., Luvisi, A., Nutricati, E., Accogli, R.A., Sabella, E., Miceli, A. (2019). Phytochemical profiles and antioxidant activity of *Salvia* species from Southern Italy, *Records Natural Products*, 13, 205-215.
30. Saraç, N., Uğur, A. (2009). The in vitro antimicrobial activities of the essential oils of some Lamiaceae species from Turkey, *Journal Medicinal Food*, 12, 902-907.
31. Exarchou, V., Kanetis, L., Charalambous, Z., Apers, S., Pieters, L., Gekas, V., Goulas, V. (2015). HPLC SPE-NMR characterization of major metabolites in *Salvia fruticosa* Mill. extract with antifungal potential: Relevance of carnosic acid, carnosol, and hispidulin, *Journal Agricultural Food Chemistry*, 63, 457-463.
32. Xavier, C.P.R., Lima, C.F., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C. (2009). *Salvia fruticosa*, *Salvia officinalis*, and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: The role in MAPK/ERK Pathway, *Nutrition Cancer*, 61, 564-571.
33. Senol, F.S., Orhan, I.E., Erdem, S.A., Kartal, M., Sener, B., Kan, Y., Celep, F., Kahraman, A., Dogan, M. (2011). Evaluation of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of wild and







- cultivated samples of Sage (*Salvia fruticosa*) by activity-guided fractionation, *Journal Medicinal Food*, 14, 1476-1483.
34. Kasabri, V., Afifi, F.U., Abu-Dahab, R., Mhaidat, N., Bustanji, Y.K., Abaza I.M., Mashallah, S. (2014). In vitro modulation of metabolic syndrome enzymes and proliferation of obesity related-colorectal cancer cell line panel by *Salvia* species from Jordan, *Revue Roumaine de Chimie*, 59, 693-705.
35. Süzgeç-Selçuk, S., Özek, T., Özek, G., Yur, S., Göger, F., Gürdal, M. B., Başer, K. H. C. (2021), The Leaf and the Gall Volatiles of *Salvia fruticosa* Miller from Turkey: Chemical Composition and Biological Activities, *Records Natural Products*, 15(1), 10-24.
36. Gündüz, S., Kara, S., Yüksel, Ç.N., Yılmaz, A.E. (2016). Acı elma yağının yanlış kullanımına bağlı dört zehirlenme vakası. *Dicle Tıp Dergisi*, 43(2), 364-366.
37. Harmancı, K., Eren, M., Koçak, A. K., İpar, N., Şahin, S. (2011). Elma yağının yanlış kullanımına bağlı gelişen kimyasal pnömoni bir olgu. *Asthma Allergy Immunol*, 9, 101-104.
38. Woolf, A.D. (2003). Herbal remedies and children: Do they work? Are they harmful? *Pediatrics*, 112, 240-246.
39. Sandler, A.D., Brazdziunas, D., Cooley, W.C., De Pijem, L., Hirsch, D., Kastner, T., Kummer, M., Quint, R., Ruppert, E., Arango, P., Burgan, P., Garner, C., McPherson, M., Michaud, L., Yeargin-Allsopp, M., Cartwright, J., Johnson, C., Smith, K.. (2001). Counseling families who choose complementary and alternative medicine for their child with chronic illness or disability. *Pediatrics*, 107, 598-601.
40. Lim, A., Cranswick, N., Skull, S., South, M. (2005). Survey of complementary and alternative medicine use at a tertiary children's hospital. *The Journal of Paediatrics and Child Health*, 41, 424-427.
41. Pitteti, R., Singh, S., Hornyak, D., Garcia, E.S., Herr, S. (2001). Complementary and alternative medicine use in children. *Pediatric Emergency Care*, 17, 165-169.
42. Ottolini, M.C., Hamburger, E.K., Lopriente, J.O., Coleman, R.H., Sachs, H.C., Madden, R., Brasseux, C., (2000). Complementary and alternative medicine use among children in the Washington, DC area. *Ambulatory Pediatrics*, 1, 122-125.
43. Spiegelblatt, L., Ammara, L.G., Pless, B.I., Guyver, A. (1994). The use of alternative medicine by children. *Pediatrics*, 94, 811-814.
44. Demirezer, L.Ö., Ersöz, T., Saraçoğlu, İ., Şener, B., Köroğlu, A., Yalçın, F.N. (2021). A'dan Z'ye Tıbbi Yağlar ve Aromatik Sular. Tamamlayıcı Tıp Onayı ve Güvenli Kullanım Önerileriyle, Hayykitap – 805, Hayat Güzeldir – 110, İstanbul.
45. Ang-Lee, M.K., Moss, J., Yuan, C.S. (2001). Herbal medicines and perioperative care. *The Journal of the American Medical Association*, 286, 208-216.
46. Tindimwebwa, G., Dambisya, Y.M. (2003). When is it herbal intoxication? A retrospective study of children admitted with herbal intoxication at Umtata General Hospital, South Africa. *The Central African Journal of Medicine*, 49, 111-114.

47. Commission Implementing Regulation (EU) (2012). No 872/2012. Official Journal of the European Union, L 267/1. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32012R0872> Erişim tarihi: 24.01.2021
48. EU Food Improvement Agents. (2020). https://ec.europa.eu/food/safety/food_improvement_agents/ Erişim tarihi: 24.01.2021
49. New Jersey Department of Health and Senior Service, (2020) <https://www.nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/1038.pdf> Erişim tarihi: 24.01.2021
50. Centers for Disease Control and Prevention (1994). <https://www.cdc.gov/niosh/idlh/123922.html> Erişim tarihi: 24.01.2021
51. Dinu, V., Kilic, A., Wang, Q., Ayed, C., Fadel, A., Harding, S. E., Yakubov, G.E., Fisk, I. D. (2020). Policy, toxicology and physicochemical considerations on the inhalation of high concentrations of food flavour. *Nature Partner Journals Science of Food*, 4(1), 1-10.
52. Kara, H., Köroğlu, A. (2018). İsveç şurubu, tarihçesi ve ülkemiz piyasasında bulunan İsveç Şurubu örneklerinin incelenmesi. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi* 42(3), 20-31.
53. Baldemir, A., Güvenç A. (2007). Adana ve Ankara aktarlarında satılan ceviz yaprağı (Juglandis folium) üzerinde morfolojik ve anatomik çalışmalar. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi* 36(2), 105-121.
54. Hürkul, M.M., Çiftçi, R.B., Köroğlu, A. (2020). Investigation of salep and salep containing products in view of food and pharmacy. *Biological Diversity and Conservation*, 13(2), 144-152.



STUDY ON SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF SOME MICHAEL-TYPE ADDITION COMPOUNDS

*BAZI MICHAEL TİPİ KATIM ÜRÜNLERİNİN SENTEZ ÇALIŞMASI VE ANTİMİKROBİYAL
AKTİVİTELERİ*

Gül BAYRAM^{1*} , Abdoul NZEYIMANA^{2,3} , Semra UTKU² , Mahmut ÜLGER⁴ ,
Gönül ASLAN⁵ , Erdoğan BERÇİN⁶ 

¹Mersin University, Vocational School of Health Services, Department of Medical Services and
Techniques, 33343, Mersin, Turkey

²Mersin University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, 33160, Mersin,
Turkey

³Ege University, Faculty of Sciences, Department of Biochemistry, 35040, Izmir, Turkey

⁴Mersin University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, 33160, Mersin,
Turkey

⁵Mersin University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, 33110, Mersin, Turkey

⁶Berçin Pharmacy, Side, 07330, Antalya, Turkey

ABSTRACT

Objective: Multidrug-resistant pathogenic bacteria, fungi, and *Mycobacterium tuberculosis* infections continue to be increasingly widespread worldwide. In organic chemistry, the tiya-Michael type addition is also significant reaction in the synthesis of bioactive compounds. In this study, the aim is to synthesize the series of new Michael type addition products 2-amino-3-[(2-nitro-1-phenylpropyl)thio]propanoic acid (IIa-IIg) and to investigate their in vitro, antibacterial, antifungal and antitubercular activity.

Material and Method: IIa-IIg derivatives were performed combining β -methyl- β -nitrostyrenes (Ia-Ig) with L-cysteine using Michael addition reaction and characterized by ¹HNMR, FTIR, ESI-LC/MS and elemental analysis. Microdilution method and resazurin microtiter assay were used to determine antimicrobial activities.

Result and Discussion: Comparing the activities of the synthesized compounds, IIa, IId and IIe were found to have significant activity, with a MIC value of 1.95 μ g/ml, against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain.

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Gül Bayram
e-mail / e-posta: gulbayram78@gmail.com, **Phone/ Tel.:** +903243412815

All synthesized novel compounds displayed moderate activity against tested bacterial and fungi strains. Among the synthesized compounds, I1b exhibited the best antibacterial and antifungal activity, with MIC values of 31.25, 31.25 and 15.6 µg/ml, against *B. subtilis*, *E. faecium* and *C. albicans*, respectively. It was clear that some of the synthesized compounds exhibited antimycobacterial activity which could be a very good candidate for clinical uses.

Keywords: Antibacterial activity, antifungal activity, antimycobacterial activity, β-methyl-β-nitrostyrene, Michael type addition

ÖZ

Amaç: Çoklu ilaca dirençli patojenik bakteri, mantar ve *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonları dünya çapında giderek yaygınlaşmaya devam etmektedir. Organik kimyada, tiya-Michael tipi katım ayrıca biyoaktif bileşiklerin sentezinde önemli bir reaksiyondur. Bu çalışmada, 2-amino-3-[(2-nitro-1-fenilpropil)tiyo]propanoik asit Michael tip yeni katım ürünlerinin (I1a-I1g) sentezi ve antibakteriyel, antifungal ve antitüberküler aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: L-sistein ile β-metil-β-nitrostirenlerden (I1a-I1g) Michael katım reaksiyonu kullanılarak I1a-I1g türevleri sentezlenmiş ve yapıları ¹HNMR, FTIR, ESI-LC/MS ve elemental analiz ile karakterize edilmiştir. Mikrodilüsyon yöntemi ve rezaurin mikrotitre deneyi antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Sentezlenen bileşiklerin aktiviteleri karşılaştırıldığında, I1a, I1d ve I1e *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv suşuna karşı, 1.95 µg/ml'lik MIC değeri ile dikkat çekici aktiviteye sahip olarak bulunmuştur. Yeni sentezlenen bileşiklerin hepsi test edilen bakteri ve mantar suşlarına karşı orta derecede aktivite göstermişlerdir. Sentezlenen bileşikler arasında, I1b, *B. subtilis*, *E. faecium* ve *C. albicans*'a karşı sırasıyla 31.25, 31.25 ve 15.6 µg/ml MIC değerleri ile en iyi antibakteriyel ve antifungal aktivite sergilemiştir. Sentezlenen bazı bileşikler gösterdikleri antimikobakteriyel aktiviteden dolayı klinik kullanım için iyi bir aday olabileceklerdir.

Anahtar kelimeler: Antibakteriyel aktivite, antifungal aktivite, antimikobakteriyel etki, β-metil-β-nitrostiren, Michael tip katım

INTRODUCTION

The course from drug development to the clinical use of antimicrobials might be one of the substantial successes in the modern history of medicine [1, 2]. Despite all the crucial outcomes of antimicrobials in maintaining lives against infections, over the years their treatment has slightly started becoming ineffective due to the development of resistance in these pathogens [3]. Furthermore, antitubercular drugs have been reduced their efficacy in different parts of the globe in particular underdeveloped regions. A recent report published by World Health Organization revealed that tuberculosis is one of the top 10 leading causes of mortality and 10 million people suffering from tuberculosis and 1.4 million have died. [4]. Also, the global spread of COVID-19 is expected to have catastrophic effects on tuberculosis incidence and mortality by 2020 in several countries. To search for the new effective antimicrobial agent, either altering or increasing the existing ones, has been a great prime concern as a result of the rapid outspread of multidrug-resistant pathogens [5, 6].

The β-nitrostyrene has attracted researchers in recent years because it has become well-known to be a central pharmacophore for various drug candidates [7-13]. Furthermore, the addition products with a β-nitrostyrene moiety have been accepted to have various pharmacological activities, especially antimicrobial and anticancer [7, 14-17].

L-cysteine, a sulfur-bearing amino acid, is mostly found in the structure-activity of proteins and enzymes, which plays an important role in detoxification in biological systems and also, potency on cellular activities such as signal proliferation, differentiation, and apoptosis [18, 19]. Over the last few years, plenty of compounds selectively evolved with the capability to alter cysteine residue in proteins and enzymes have been made, having pledge in the domain of drug design and the development of pesticides [18].

Therefore, Ia-Ig derivatives containing L-cysteine is believed to have a great potency against resistant pathogens. To achieve this, the Michael addition reaction will take place where Ia-Ig, considered as Michael acceptor, has a strong electron-withdrawing from the nitro group and thiol of L-cysteine under mild reacting conditions [20, 21].

Considering the results of our studies [15-17] and the evaluation of the literature survey, the aim of the present work is to synthesis substituted β -methyl- β -nitrostyrene considered as pharmacophore and Michael type addition products with L-cysteine for evaluating the antibacterial, antifungal and antimycobacterial activities.

MATERIAL AND METHOD

Chemistry

All chemicals and solvents used were of reagent grade (Merck or Aldrich). IR spectra were obtained using a Perkin Elmer Spectrum FT-IR/NIR spectrometer equipped with a Universal ATR Sampling Accessory. Elemental analyses were performed with LECO 932 CHNS analyzer, ^1H NMR spectra were recorded in DMSO- d_6 (Merck) on a Varian Mercury 400 MHz FT-NMR spectrometer using tetramethylsilane as the internal standard and ESI-LC/MS spectra were taken on a Water Micromass ZQ connected with Waters Alliance HPLC, using ESI (+) or ESI (-) methods. Thin layer chromatography (TLC) was performed on precoated Silica Gel 60 F254 aluminum plates (Merck). Melting points of Ia-Ig and IIa-IIg derivatives were determined in Electrothermal 9200 melting point apparatus and the values were not corrected.

Synthesis of β -methyl- β -nitrostyrene (Ia-Ig) derivatives

The Ia-Ig compounds are well-known compounds that have been previously synthesized by many researchers. In this study, it was synthesized by us with the method given in the literature.¹⁰ Briefly, the Ia-Ig derivatives were synthesized by refluxing the nitroethane and suitable aromatic aldehyde derivatives in acetic acid and ammonium acetate catalyst for 5 hours as shown in Figure 1. End of the reaction was determined using TLC, the final products were ultimately cooled out by pouring in iced water. Then, the obtained precipitate was crystallized from ethanol.

Synthesis of 2-amino-3-[(2-nitro-1-phenylpropyl)thio]propanoic acid (IIa-IIg) derivatives

The synthesis of IIa-IIg derivatives took place following Michael addition reaction, where 0.05 mol L-cysteine with 0.05 mol appropriate Ia-Ig derivatives were dissolved in (10-15 mL) ethanol and the reaction was maintained stirred at room temperature for 3-4 hours as shown in Figure 1. The ending reaction was pointed out using TLC and the precipitate was filtered and washed using cold ethanol for several times.

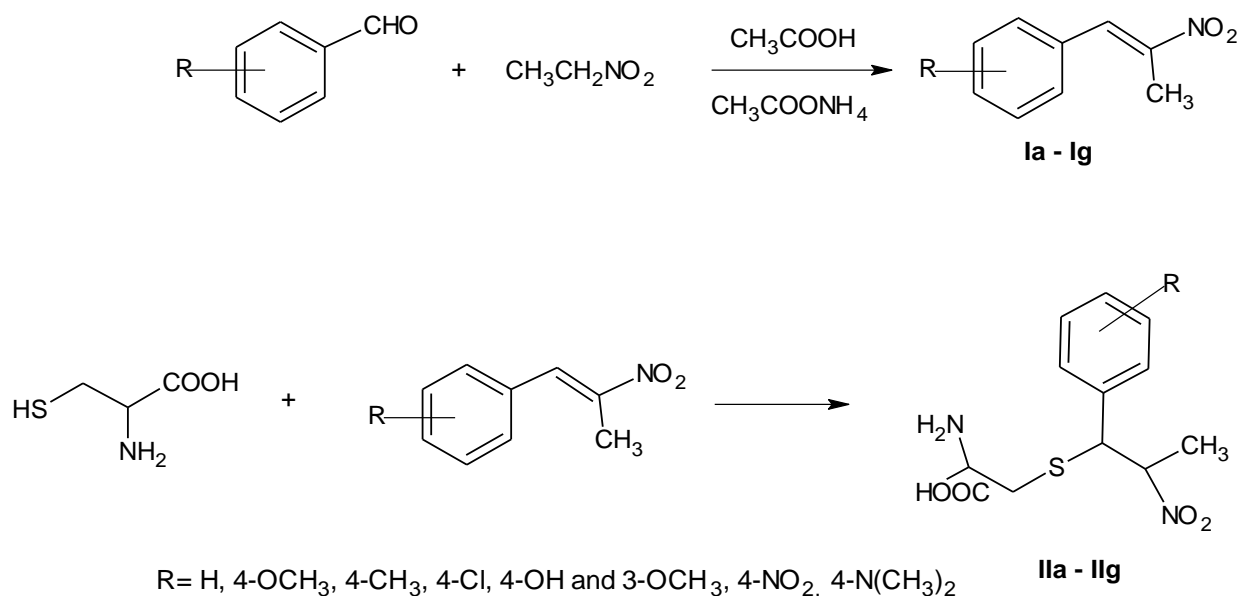


Figure 1. Synthesis of β -methyl- β -nitrostyrene and 2-amino-3-[(2-nitro-1-phenylpropyl)thio] propanoic acid derivatives.

2-Amino-3-[(2-nitro-1-phenylpropyl)sulfanyl]propanoic acid (2a)

Yield: 74%; m.p.: 183 °C; FTIR-ATR: 3249 (N-H), 3031 (aromatic C-H), 1617, 1583, 1418 (COO and aromatic C=C), 1545, 1343 (NO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 1.30 (3H, d, J= 6.7 Hz, CH₃), 2.64-2.75 (2H, m, -CH₂-S-), 3.10-3.12 (m, 1H, -CH-COO-), 4.49 (1H, d, J= 4.8 Hz, -CH-S-), 5.15-5.19 (m, 1H, -CH-NO₂), 7.26-7.41 (m, 5H, ArH) ppm; HRMS calcd. for C₁₂H₁₇N₂O₄S [M+H]⁺: 285.3393. Found 285.3395. Anal. calcd. for C₁₂H₁₆N₂O₄S.H₂O: C, 47.67; H, 6.00; N, 9.27; S, 10.61. Found: C, 47.65; H, 5.85; N, 9.44; S, 10.86.

2-Amino-3-[[1-(4-methoxyphenyl)-2-nitropropyl]sulfanyl]propanoic acid (2b)

Yield: 33%; m.p.: 174 °C; FTIR-ATR: 3231 (N-H), 3029 (aromatic C-H), 1594, 1514, 1425 (COO and aromatic C=C), 1545, 1391 (NO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 1.29 (3H, d, J= 6.8 Hz, CH₃), 2.49-2.69 (2H, m, -CH₂-S-), 3.08-3.12 (m, 1H, -CH-COO-), 3.74 (3H, d, Ar-OCH₃, J= 6.8 Hz), 4.44 (1H, d, J= 4.8 Hz, -CH-S-), 5.11-5.13 (m, 1H, -CH-NO₂), 6.86-6.92 (m, 2H, ArH), 7.26-7.32 (m, 2H, ArH)

ppm; HRMS calcd. for $C_{13}H_{19}N_2O_5S$ $[M+H]^+$: 315.3653. Found 315.3650. Anal. calcd. for $C_{13}H_{18}N_2O_5S.H_2O$: C, 46.98; H, 6.07; N, 8.43; S, 9.65. Found: C, 46.85; H, 5.93; N, 8.64; S, 9.95.

2-Amino-3-([1-(4-methylphenyl)-2-nitropropyl]sulfanyl)propanoic acid (2c)

Yield 77%; m.p.: 170-171 °C; FTIR-ATR: 3220 (N-H), 3035 (aromatic C-H), 1606, 1513, 1418 (COO and aromatic C=C), 1551, 1391 (NO_2) cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO- d_6): δ 1.29 (3H, d, $J=6.8$ Hz, CH_3), 2.28 (3H, s, Ar- CH_3 , $J=8$ Hz), 2.61-2.69 (2H, m, $-CH_2-S-$), 3.09-3.11 (m, 1H, $-CH-COO-$), 4.44 (1H, d, $J=4.8$ Hz, $-CH-S-$), 5.11-5.15 (m, 1H, $CH-NO_2$), 7.11-7.17 (m, 2H, ArH), 7.22-7.27 (m, 2H, ArH) ppm; HRMS calcd. for $C_{13}H_{19}N_2O_4S$ $[M+H]^+$: 299.3659. Found 299.3660. Anal. calcd. for $C_{13}H_{18}N_2O_4S.1/2H_2O$: C, 50.80; H, 6.23; N, 9.11; S, 10.43. Found: C, 50.65; H, 6.11; N, 9.43; S, 10.48.

2-Amino-3-([1-(4-chlorophenyl)-2-nitropropyl]sulfanyl)propanoic acid (2d)

Yield 79%; m.p.: 186 °C; FTIR-ATR: 3225 (N-H), 3135 (aromatic C-H), 1610, 1513, 1419 (COO and aromatic C=C), 1552, 1389 (NO_2) cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO- d_6): δ 1.31 (3H, d, $J=6.4$ Hz, CH_3), 2.62-2.72 (2H, m, $-CH_2-S-$), 3.10-3.13 (m, 1H, $CH-COO-$), 4.53-4.59 (1H, m, $CH-S-$), 5.18-5.24 (m, 1H, $CH-NO_2$), 7.38-7.40 (m, 2H, ArH), 7.41-7.43 (m, 2H, ArH) ppm; HRMS calcd. for $C_{12}H_{16}ClN_2O_4S$ $[M+H]^+$: 319.7844. Found 319.7845. Anal. calcd. for $C_{12}H_{15}ClN_2O_4S$: C, 45.21; H, 4.74; N, 8.79; S, 10.06. Found: C, 45.15; H, 4.70; N, 8.90; S, 10.19.

2-Amino-3-([1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-nitropropyl]sulfanyl)propanoic acid (2e)

Yield 59%; m.p.: 176 °C; FTIR-ATR: 3215 (N-H), 3049 (aromatic C-H), 1612, 1584, 1418 (COO and aromatic C=C), 1544, 1389 (NO_2) cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO- d_6): δ 1.30 (3H, d, $J=6.4$ Hz, CH_3), 2.63-2.71 (2H, m, $-CH_2-S-$), 3.12-3.15 (m, 1H, $-CH-COO-$), 3.76 (3H, s, $-OCH_3$), 4.41-4.36 (1H, m, $-CH-S-$), 5.20-5.11 (m, 1H, $-CH-NO_2$), 6.78-6.68 (m, 2H, ArH), 6.97-6.91 (m, 1H, ArH) ppm; HRMS calcd. for $C_{13}H_{19}N_2O_6S$ $[M+H]^+$: 331.3647. Found 331.3649. Anal. calcd. for $C_{13}H_{18}N_2O_6S$: C, 47.26; H, 5.49; N, 8.48; S, 9.71. Found: C, 47.32; H, 5.56; N, 8.49; S, 9.63.

2-Amino-3-([1-(4-nitrophenyl)-2-nitropropyl]sulfanyl)propanoic acid (2f)

Yield 73%; m.p.: 178 °C; FTIR-ATR: 3213 (N-H), 3053 (aromatic C-H), 1650, 1525, 1447 (COO and aromatic C=C), 1531, 1374 (NO_2) cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO- d_6): δ 1.34 (3H, d, $J=6.4$ Hz, CH_3), 2.77-2.64 (2H, m, $-CH_2-S-$), 3.26-3.21 (m, 1H, $-CH-COO-$), 4.80-4.72 (1H, m, $-CH-S-$), 5.40-5.28 (m, 1H, $-CH-NO_2$), 7.80-7.68 (m, 2H, ArH), 8.24-8.19 (m, 2H, ArH) ppm; HRMS calcd. for $C_{12}H_{16}N_3O_4S$ $[M+H]^+$: 330.3374. Found 330.3378. Anal. calcd. for $C_{12}H_{15}N_3O_4S$: C, 43.76; H, 4.59; N, 12.76; S, 9.74. Found: C, 43.60; H, 4.32; N, 12.90; S, 9.73.

2-Amino-3-([1-[4-(dimethylamino)phenyl]-2-nitropropyl]sulfanyl)propanoic acid (2g)

Yield 58%; m.p.: 188 °C; FTIR-ATR: 3217 (N-H), 3053 (aromatic C-H), 1590, 1488, 1447 (COO and aromatic C=C), 1488, 1374 (NO_2) cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO- d_6): δ 1.29 (3H, d, $J=6.4$ Hz, CH_3), 2.77-

2.64 (2H, m, $-CH_2-S-$), 2.89 (s, 3H, $-N(CH_3)$), 3.01 (s, 3H, $-N(CH_3)$), (3.33-3.26 (m, 1H, $-CH-COO-$), 4.40-4.34 (1H, m, $-CH-S-$), 5.09-5.04 (m, 1H, $-CH-NO_2$), 7.18-7.13 (m, 2H, ArH), 6.81-6.78 (m, 2H, ArH) ppm; HRMS calcd. for $C_{14}H_{22}N_3O_4S$ $[M+H]^+$: 328.4071. Found 328.4076. Anal. calcd. for $C_{14}H_{21}N_3O_4S$ C, 51.36; H, 6.47; N, 12.83; S, 9.79. Found: C, 51.19; H, 6.68; N, 12.74; S, 9.92.

Biological Activity

Antibacterial and Antifungal Activity Methods

To determine the minimum inhibitory concentrations of antibacterial and antifungal activities of IIa-IIg derivatives; Gram-positive and negative bacteria and *Candida* species were tested using the American Type Culture Collection (ATCC) reference species. Ampicilline.3H₂O and fluconazole were used as reference compounds in antibacterial and antifungal activity test, respectively. All the tested isolates were reference strains. Hence, ethical approval was not required.

Modified serial microdilution method was applied in antibacterial and antifungal tests of IIa-IIg derivatives [22, 23]. Lyophilized bacterial strains and fungal strains were subcultured in Mueller-Hinton Agar at 37 °C for 24 h and sabouraud dextrose agar at 28 °C for 24 h, respectively. Stock solutions of each compound to be tested were prepared at 1000 µg/ml in DMSO/H₂O (50%). All compound's stock solutions and reference compounds were prepared at 500, 250 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.82, 3.9, 1.95, 0.97 and 0.48 µg/ml. The suspensions of the bacteria and fungi strains were prepared in normal saline solution. The turbidity was adjusted to 0.5 Mcfarland with an absorbance of 0.08-0.13 at 625 nm. 100 µL Mueller-Hinton Broth (MHB) or Tryptic Soy broth used in the antibacterial or antifungal activity test were added to only 11 wells of plates with 96-well plates. A 100 µL of tested compound liquor was added to the first well and then two fold dilutions were performed. The microorganism suspension was added to each well except for the last row and then incubated at 37 °C for 24 h for antimicrobial and 28 °C for 24 h for antifungal activities. At the end of the incubation period, minimum inhibitory concentration (MIC) values were evaluated by spectrophotometer at 450 nm in all plates. Biological activity tests were carried out duplicate independently according to literature.

Antimycobacterial Activity Methods

The antitubercular activities of IIa-IIg derivatives were tested according to the REMA plate technique with minor modifications [24, 25]. As a standard strain, *M. tuberculosis* H37Rv was used and ensured from the National Tuberculosis Reference Laboratory, Ankara, Turkey. Lowenstein-Jensen medium was used for maintenance of Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv.

In REMA technique, Middlebrook 7H9-S broth (Difco), supplemented with 0.5% glycerol, 0.1% casitone and 10% oleic acid-albumin-dextrose-catalase was used as a subculturing medium at 37°C for 7-10 days until the turbidity of the supernatant was adjusted to McFarland standard No.1 A solution of 0.01% resazurin sodium salt (Sigma R7017) was prepared with distilled water and then sterilized using a

0.22 μm membrane filter (Ministar, Sartorius, Germany) was kept at 4°C. The compounds IIa-IIg and were dissolved in DMSO/H₂O (50%) at a concentration of 1000 $\mu\text{g/ml}$. Rifampicin (Sigma, R3501) and isoniazid (Sigma, I3377) were used as reference antitubercular agents. Test compounds were sterilized using a 0.22 μm membrane filter followed by serial two fold dilutions tested in a 96-well microtiter plate. 100 μL compound and 100 μL Middlebrook 7H9-S broth suspension were performed each well. To each plate was added a growth control without test compound and a sterility control without inoculum. The test concentration ranges of the newly synthesized and reference compounds were used as 500-0.12 g/ml . Plates were incubated 37°C in a normal atmosphere for 7 days. After incubation was completed, 30 μl resazurin was added to all wells and then microtiter plates were incubated for 24 h at 37°C. The MIC value was determined by evaluating the lowest suspension concentration that inhibited the color change of resazurin. Antitubercular activity test was performed in duplicate independently according to literature.

RESULT AND DISCUSSION

Ia-Ig and target compound IIa-IIg derivatives were prepared by a nitro aldol condensation and Michael addition reaction, respectively. Ia-Ig were synthesized by the reaction of nitroethane and benzaldehyde derivatives with the same nitroaldol condensation pattern of the intended product, using ammonium acetate as catalyst (Figure 1) [10]. The final compounds were obtained by the reaction of the Ia-Ig derivatives with L-cysteine. The results of the experimental processes of these newly synthesized compounds have shown that the average/high level of consideration is reached as can be seen in the experimental section.

The final products (IIa-IIg) and their structures outlined in Figure 1 were identified by FT-IR, ¹H NMR, ESI-LC/MS spectroscopic techniques. The elemental analysis data for IIa-IIg derivatives were found to be consistent with the proposed empirical formula. In the IR spectrum, the concrete characteristic was described at N-H, NO₂, COO- and C=C stretching bands at 3215-3249, 1374-1545 cm^{-1} and 1418-1650 cm^{-1} , respectively and the ¹H NMR and ESI-L/MS spectra were shown in the experimental section. These spectral and elemental analyses data described the purity and structure of desired compounds.

When the ¹H NMR spectra of the final products, it was found that the chemical shift values and hydrogen numbers were consistent with the corresponding protons. It should also be noted that for IIa-IIg diastereomeric compounds, it was observed that -CH₂-S- protons were coupled with -CH-COO- protons and appeared as multiplets were seen in the experimental section. These observations were consistent with those reported in the literature [16, 26, 27]. The retention times of the peak in the samples and the ESI-LC/MS spectrum are evidence that IIa-IIg is pure and suggested chemical structures. The findings obtained from this spectral analysis indicate that the newly synthesized compounds have the desired purity and chemical structure.

It can be estimated that the compound with three chiral centers is quite difficult to separate diastereomers. Therefore the Michael addition products of L-cysteine with Ia-Ig derivatives are an asymmetric process because two novel chiral centers were created, namely, α and β carbon atom in the starting materials. Therefore, configurational diastereomers that are thought to have high pharmacological activity will be synthesized as organocatalytic diastereo- and enantioselective Sulfa-Michael addition products in later studies.

The biological properties such as antimicrobial, antifungal and antimycobacterial activities of IIa-IIg derivatives were tested against four Gram-positive and five Gram-negative bacteria, four fungi species and *M. tuberculosis* H37Rv using the microdilution broth method and REMA according to recommendations techniques [22-25]. Ampicilline.3H₂O, fluconazole, isoniazid and rifampicin were used as a reference in antibacterial, antifungal and antimycobacterial activity test, respectively (Table 1 and 2). A comparison of the activities of synthesized compounds IIa-IIg showed that compound IIb, with a methoxy substituent, was the most potent compound, with MIC value of 31.25 $\mu\text{g/ml}$ versus *B. subtilis*, *E. faecium*. Compounds IIa, IIc-IIg with a MIC of 62.50 $\mu\text{g/ml}$ were found to have the same activity as ampicilline.3H₂O against *E. faecium*. Compounds IIb and IId exhibited significant antifungal activity with MIC value of 15.16 $\mu\text{g/ml}$ against *C. albicans* which were comparable with fluconazole as a reference drug. It is well known that the antifungal drug fluconazole is used clinically to treat or suppress various infections [28]. This result suggests that compound IIb may be worth further study in terms of their antifungal activity. We will continue our investigations to determine *in vivo* antifungal and antibacterial activities of compound IIb.

Table 2 outlines the *in vitro* results of antimycobacterial activities for the synthesized compounds (IIa-IIg), determined as MIC values. All compounds were considerably found to hold a significant activity against *M. tuberculosis* H37Rv strains. The lowest MIC value was observed from compounds IIa, IId and IIe with 1.95 $\mu\text{g/ml}$ whereas the intermediate expressed by IIb, IIc, and IIf were 3.9, 7.81 and 7.81 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Compound IIg with a MIC value of 31.25 $\mu\text{g/ml}$ was found to be the least active compound in the compounds tested against *M. tuberculosis* H37Rv.

Having said that β -nitrostyrene has become a pharmacophore in drug design, this potential action may be observed throughout the structural conformation and physicochemical properties belonging to the ring and nitrovinyl [10, 12, 29]. β -nitrostyrene derived from electron withdrawal or donating aromatic substitutions to the *o*, *m* or *p* position showed the antimicrobial activity [8, 29]. Negative mesomeric effect of nitro group in nitro-vinyl structure gives to the benzylic position a partial positive charge and thus also the ability to react as electron accepting feature. So benzylic carbon reacts as the electron accepting centre from any nucleophiles in the Michael addition reaction. The bond formed by the sulfur and benzylic carbon in the addition product is stable enough to reach the acting site, after that it is effective enough to

change structurally the important proteins in microorganisms. Probably it reacts with the nucleophilic groups of proteins in the microorganism and transports the cysteine molecule to the protein.

Recent studies showing that L-cysteine carries various activities to cellular functions have made it easy to explain why L-cysteine modified compounds show higher activity. This screening might have an impact on increasing antimicrobial activity. Therefore, considering the previous studies on β -nitrostyrene derivatives without L-cysteine, these compounds have shown a tremendous effect on tested strains.

Table 1. Antibacterial and antifungal activity of IIa-IIg derivatives against reference bacteria and fungus strains

Compd. R	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
IIa, 4-H	125	62.5	125	125	125	62.5	125	125	125	31.25	62.5	125	250
IIb, 4-OCH ₃	31.25	31.25	62.5	125	125	62.5	125	125	125	15.6	31.25	125	125
IIc, 4-CH ₃	125	62.5	125	125	125	62.5	125	125	125	125	125	125	125
IIId, 4-Cl	125	62.5	62.5	125	125	62.5	125	125	125	15.6	62.5	125	250
IIe, 4-OH-3-OCH ₃	125	62.5	125	125	125	62.5	125	125	125	125	62.5	125	250
IIIf, 4-NO ₂	125	62.5	125	125	125	62.5	125	125	125	125	125	125	125
IIg, 4-N(CH ₃) ₂	125	62.5	125	125	125	62.5	125	125	62.5	250	250	125	125
Amp.	< 0.48	62.5	< 0.48	31.25	7.8	< 0.48	31.25	7.8	31.25	*	*	*	*
Fluc.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	31.25	< 0.48	< 0.48	< 0.48

A: *Bacillus subtilis subsp. subtilis* (ATCC 6051), B: *Enterococcus faecium* (VanR QC set ATCC 700221), C: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), D: *Enterobacter hormaechei* (ATCC 700323), E: *Klebsiella pneumonia* (ATCC 27736), F: *Acinetobacter baumannii* (ATCC 49139), G: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), H: *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 35150), I: *Stenotrophomonas maltophilia* (ATCC 17666), J: *Candida albicans* (ATCC 14053), K: *Candida glabrata* (ATCC 15126), L: *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), M: *Candida tropicalis* (ATCC 1969), Amp: Ampicilline.3H₂O, Fluc: Fluconazole. *: Not tested.

Table 2. Antitubercular activity of IIa-IIg derivatives against *M. tuberculosis* H37Rv

Compd., R	MIC (μ g/ml)
IIa, 4-H	1.95
IIb, 4-OCH ₃	3.9
IIc, 4-CH ₃	7.81
IIId, 4-Cl	1.95
IIe, 4-OH,3-OCH ₃	1.95
IIIf, 4-NO ₂	7.81
IIg, 4-N(CH ₃) ₂	31.25
Isoniazid	0.12
Rifampicin	0.97

Drug resistance has increasingly affected the clinically used antibiotics which weakened the efficiency of treatment against infections. Working on the novel antimicrobial agent is a preliminarily

concerned issue for the researchers for fighting the problem. In this regard, the newly synthesized Michael-type addition products IIa-IIg compounds displayed relevant preliminary activity which motivates us to move forward for achieving the main goal.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Mersin University Scientific Research Funds (Grant number 2018-1-AP2-2782).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception: G.B., S.U., E.B.; Design: G.B., A.N., S.U., M.Ü., G.A., E.B.; Supervision: G.B., A.N., S.U., M.Ü.; Resources: G.B., S.U., G.A.; Materials: G.B., S.U., M.Ü., G.A.; Data collection and/or processing: G.B., A.N., S.U., M.Ü., G.A.; Analysis and/or interpretation: G.B., A.N., S.U., M.Ü.; Literature search: G.B., A.N., S.U.; Writing manuscript: G.B., A.N., S.U., M.Ü., G.A., E.B.; Critical review: G.B., A.N., S.U., M.Ü., G.A., E.B.; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Gajdacs, M. (2019). The concept of an ideal antibiotic: implications for drug design. *Molecules*, 24, 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules24050892>
2. Gajdacs, M., Albericio, F. (2019). Antibiotic resistance: from the bench to patients. *Antibiotics*, 8, 1–4. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030129>
3. Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A.K.M, Wertheim, H.F.L., Sumpradit, N., Vieghe, E., Hara, G.L., Gould, I.M., Goossens, H., Greko, C., So, A.D., Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W., Ombaka, E., Peralta, A.Q., Qamar, F.N., Mir, F., Kariuki, S., Bhutta, Z.A., Coates, A., Bergstrom, R., Wright, G.D., Brown, E.D., Cars, O. (2013). Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infectious Disease*, 13, 1057–1098. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9)
4. World Health Organization Web Site. (2020). Retrieved January 14, 2021, from <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf>
5. Nielsen, S.F., Boesen, T., Larsen, M., Schonning, K., Kromann, H. (2004). Antibacterial chalcones-bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12, 3047–3054. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.03.071>

6. Narasimhan, B., Belsare, D., Pharande, D., Mourya, V., Dhake, A. (2004). Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *39*, 827–834. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2004.06.013>
7. Kaap, S., Quentin, I., Tamiru, D., Shaheen, M., Eger, K., Steinfelder, H.J. (2003). Structure activity analysis of the pro-apoptotic, antitumor effect of nitrostyrene adducts and related compounds. *Biochemical Pharmacology*, *65*, 603–610. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)01618-0](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(02)01618-0)
8. Mikami, Y., Yazawa, K., Maeda, A., Uno, J., Kubo, A., Saito, N., Kawakami, N. (1991). Antifungal activity of SL-1, a beta-nitrostyrene type pigment and its synthetic congeners. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, *44*, 1454–1456. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.44.1454>
9. Wang, W.Y., Wu, Y.C., Wu, C.C. (2006). Prevention of platelet glycoprotein IIb/IIIa activation by 3,4-methylenedioxy- β -nitrostyrene, a novel tyrosine kinase inhibitor. *Molecular Pharmacology*, *70*, 1380–1389. <https://doi.org/10.1124/mol.106.023986>
10. Milhazes, N., Calheiros, R., Marques, M.P., Garrido, J., Cordeiro, M.N., Rodrigues, C., Cordeiro, M.N.D.S., Rodrigues, C., Quinteira, S., Novais, C., Peixe, L., Borges, F. (2006). β -Nitrostyrene derivatives as potential antibacterial agents: a structure-property-activity relationship study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *14*, 4078–4088. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.02.006>
11. Hsieh, P.W., Chang, Y.T., Chuang, W.Y., Shih, H.C., Chiang, S.Z., Wu, C.C. (2010). The synthesis and biologic evaluation of anti-platelet and cytotoxic β -nitrostyrenes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *18*, 7621–7627. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.08.039>
12. Cornell, H., Nguyen, T., Nicoletti, G., Jackson, N., Hügel, H. (2014). Comparisons of halogenated β -nitrostyrenes as antimicrobial agents. *Applied Sciences*, *4*, 380–389. <https://doi.org/10.3390/app4030380>
13. Villar, J.A.F.P., Lima, F.T.D., Veber, C.L., Oliveira, A.R.M., Calgarotto, A.K., Marangoni, S., Silva, S.L. (2008). Synthesis and evaluation of nitrostyrene derivative compounds, new snake venom phospholipase A2 inhibitors. *Toxicon*, *51*, 1467–1478. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.03.023>
14. Rahmani-Nezhad, S., Safavi, M., Pordeli M., Ardestani, S.K., Khosravani, L., Pourshojaei, Y., Emami, M. S., Foroumadi, A., Shafiee, A. (2014). Synthesis, in vitro cytotoxicity and apoptosis inducing study of 2-aryl-3-nitro-2H-chromene derivatives as potent anti-breast cancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *86*, 562–569. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.09.017>
15. Gokce, M., Ozcelik, B., Bakır, G., Karaoğlu, T., Bercin, E., Noyanalpan, N. (2004). Antiviral and antimicrobial activities of new nitrobutane derivatives. *Arzneimittel-Forschung*, *54*, 891–897. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1297045>
16. Gokce, M., Utku, S., Bercin, E., Özcelik, B., Karaoglu, T., Noyanalpan, N. (2005). Synthesis and in vitro antimicrobial and cytotoxicity activities of 2-[(2-nitro-1-phenylalkyl) thio] benzoic acid derivatives. *Turkish Journal of Chemistry*, *29*, 207–217.
17. Utku, S., Gokce, M., Ozcelik, B., Bercin, E. (2008). Evaluation of antimicrobial activity of 2-[(2-nitro-1-phenylalkyl)thiomethyl] benzimidazole derivatives. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, *5*, 107–116.

18. Shi, Y., Carroll, K.S. (2020). Activity-based sensing for site-specific proteomic analysis of cysteine oxidation. *Accounts of Chemical Research*, 53, 20–31. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00562>
19. Piste, P. (2013). Cysteine-master antioxidant. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 3, 143–149. <https://doi.org/10.3329/jbsp.v2i0.978>
20. Sobhani, S., Rezazadeh, S. (2010). Michael addition reaction of thioacetic acid (AcSH) to conjugated alkenes under solvent- and catalyst-free conditions. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 185, 2076–2084. <https://doi.org/10.1080/10426500903496713>
21. Pei, Q. L., Han, W. Y., Wu, Z. J., Zhang, X. M., & Yuan, W. C. (2013). Organocatalytic iastereo- and enantioselective sulfa-Michael addition to α , β -disubstituted nitroalkenes. *Tetrahedron*, 69(26), 5367–5373. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.04.125>
22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS). (2008). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 18th Informational Supplement. CLSI M100-S18, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS). (2006). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast Approved Standard, M27-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA.
24. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2003). Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia, and Other Aerobic Actinomycetes: Approved Standard NCCLS Document M24-A. Wayne, Pennsylvania.
25. Nateche, F., Martin, A., Baraka, S., Palomino, J.C., Khaled, S., Portaels, F. (2006). Application of the resazurin microtitre assay for detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Algiers. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 857–860. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46513-0>
26. Bercin, E., Ozguçlu, S. (2005). The addition products of β -methyl- β -nitrostyrene derivatives with 2-mercaptomethylbenzimidazole and their NMR studies. *Journal of Faculty of Pharmacy Gazi*, 13, 133–142.
27. Demir-Ordu, O., Demir-Dundar, H., Ozkirimli, S. (2015). Stereochemical Investigations of diastereomeric N-[2-(aryl)-5-methyl-4-oxo-1,3-thiazolidine-3-yl]-pyridine-3-carboxamide by nuclear magnetic resonance spectroscopy (1D and 2D). *International Journal of Spectroscopy*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/609250>
28. Shafiei, M., Peyton, L., Hashemzadeh, M., Foroumadi, A. (2020). History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. *Bioorganic Chemistry*, 104, 104240. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104240>
29. Pettit, R.K., Pettit, G.R., Hamel, E. Hamel, Hogan, F., Moser, B.R., Wolf, S., Pon, S., Chapuis, J.C., Schmidt, J.M. (2009). E-combretastatin and E-resveratrol structural modifications: Antimicrobial and cancer cell growth inhibitory β -E-nitrostyrenes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 6606–6612. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.07.076>



COVID-19 PANDEMİSİNİN TOPLUM ECZACILIĞI HİZMETLERİNE ETKİLERİ

THE EFFECTS OF COVID-19 PANDEMIC ON COMMUNITY PHARMACY SERVICES

Muammer ÇALIKUŞU^{1*} , Gülsen GÜNEŞ² , Gülbin ÖZÇELİKAY¹ 

¹Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık İşletmeciliği Anabilim Dalı, 06100, Ankara, Türkiye

²İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Halk Sağlığı Anabilim Dalı, 44280, Malatya, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışma, Covid-19 pandemi sürecinin Türkiye’deki toplum eczanelerinde verilen eczacılık hizmetlerine etkilerini ortaya koymak üzere yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Araştırma tanımlayıcı nitelikte olup; araştırmada niceliksel araştırma tipinde araştırmacılar tarafından hazırlanan anket formu kullanılmıştır. Anket formları, online olarak gönüllülere ulaştırılmış; aydınlatılmış onam formu ile katılımcılar bilgilendirilerek onay vermeleri halinde araştırmaya katılmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Ülkemizdeki toplum eczacılarının pandemi sürecinde büyük bir özveriyle eczacılık hizmetlerini verdikleri ancak aynı zamanda birçok sorunla da başa çıktıkları anlaşılmaktadır. Özellikle, maskelerin ücretsiz olarak toplum eczaneleri aracılığıyla verilmesi eczacıların iş yükünü artırarak eczacılık hizmetlerinde bazı aksamalara neden olmuş, buna ek olarak vatandaşların maske almak üzere eczanelerde yoğunluk oluşturması mesafenin korunamaması riskini doğurarak bulaş ihtimalini de arttırmıştır. Toplum eczacılarının pandemi süresince başlıca yaşadığı sorunlar; kişisel koruyucu ekipman ve hijyen malzemelerine talebin fazla olması nedeniyle iş yükünün artması, personel ihtiyacı, hastalıktan korunmak için kendi imkanları ile tedbir almaları, toplumun ihtiyaç duyduğu ilaç ve ürünlerin dağıtım kanalları tarafından zamanında teslim edilmemesi ve özellikle ekonomik sorun yaşayan eczacıların ekonomik ve/veya sosyal destek alabilecekleri kurum veya kuruluşların olmaması olarak ortaya çıkmıştır. Yakın dönemde bir benzeri yaşanmamış büyüklükteki bu pandemiyle mücadelede ulusal bir acil durum eylem planı varlığının toplum eczacıları için yol gösterici olacağı çalışmanın önemli sonuçlarındandır.

Anahtar Kelimeler: Covid-19, eczacılık hizmetleri, pandemi, toplum eczaneleri

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to demonstrate the effects of Covid-19 pandemic to the pharmaceutical services in community pharmacies in Turkey.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Muammer Çalığıuşu
e-posta / e-mail: muammercalikus@hotmai.com, Tel. / Phone: +903122033127

Material and Method: *This research is a descriptive study. In the study, a quantitative research questionnaire form prepared by the researchers was used. Questionnaires were delivered to the volunteers online. Participants were informed and participated in the study if they gave their consent with an informed consent form.*

Result and Discussion: *It is understood that the community pharmacists in Turkey provide their pharmacy services with great devotion during the pandemic process, but they also cope with many problems. In particular, giving the masks free of charge through community pharmacies increased the workload of pharmacists and caused some disruptions in pharmacy services, in addition, the crowd of the citizens in pharmacies to buy masks increased the risk of social distancing and the possibility of transmission. Major problems faced by community pharmacists during the pandemic; Due to the high demand for personal protective equipment and hygiene materials, the increase in workload, the need for personnel, taking measures with their own means to protect against disease, not delivering drugs and products needed by the society on time, economic and / or social support, especially for the pharmacists have economic problems It is one of the important results of the study that the existence of a national emergency action plan will guide community pharmacists in combating this pandemic of unprecedented magnitude*

Keywords: *Community pharmacies, covid-19, pandemic, pharmacy services*

GİRİŞ

Pandemi, çok geniş bir alanda yayılan ve beklenenin üzerinde etkisini gösteren salgın hastalıklara verilen genel addır. Koronavirüs hastalığı (Covid-19), ilk olarak Çin'in Vuhan Eyaleti'nde 2019 yılı Aralık ayının sonlarında solunum yolu belirtileri (ateş, öksürük, nefes darlığı, nefes alma zorlukları) gelişen bir grup hastada yapılan araştırmalar sonucunda 13 Ocak 2020'de tanımlanan bir virüsün neden olduğu bir hastalıktır [1]. Semptomların maruziyetten 2-14 gün sonra ortaya çıkabileceği belirtilmektedir [2]. Daha ciddi vakalarda, enfeksiyon pnömoniye, ciddi akut solunum sendromuna, organ yetmezliğine ve hatta ölüme neden olabilmektedir [3]. Virüs son derece bulaşıcıdır ve insandan insana bulaş yoluyla hızla yayılmaktadır. Koronavirüsler (CoV), soğuk algınlığı gibi toplumda yaygın görülen, hafif enfeksiyon tablolarından, Orta Doğu Solunum Sendromu (Middle East Respiratory Syndrome, MERS-CoV) ve Ağır Akut Solunum Sendromu (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS-CoV) gibi daha ciddi enfeksiyon tablolarına neden olabilen büyük bir virüs ailesidir. SARS-CoV, 21.yüzyılın ilk uluslararası sağlık acil durumu olarak 2003 yılında, daha önceden bilinmeyen bir virüs halinde ortaya çıkmış olup yüzlerce insanın hayatını kaybetmesine neden olmuştur. Yaklaşık 10 yıl sonra koronavirüs ailesinden, daha önce insan ya da hayvanlarda varlığı gösterilmemiş olan MERS-CoV, Eylül 2012'de ilk defa insanlarda Suudi Arabistan'da tanımlanmış; ancak daha sonra aslında ilk vakaların Nisan 2012'de Ürdün Zarqa'daki bir hastanede görüldüğü ortaya çıkmıştır.

31 Aralık 2019'da Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Çin Ülke Ofisi, Çin'in Hubei eyaletinin Vuhan şehrinde etiyojisi bilinmeyen pnömoni vakalarını bildirmiştir. 7 Ocak 2020'de etken daha önce insanlarda tespit edilmemiş yeni bir koronavirüs (2019-nCoV) olarak tanımlanmıştır. Daha sonra 2019-nCoV hastalığının adı Covid-19 olarak kabul edilmiş, virüs SARS CoV'a yakın benzerliğinden dolayı SARS-CoV-2 olarak isimlendirilmiştir. SARS-CoV-2'nin kökeni hala araştırılmaktadır. Eldeki veriler, Huanan deniz ürünleri toptan satış pazarında yasa dışı olarak satılan vahşi hayvanları işaret etmektedir [4,

5]. DSÖ koronovirüsü küresel bir salgın olarak ilan etmiştir. Hastalığın önlenmesinin sadece sosyal mesafe ve kişisel hijyen yoluyla olabileceği önerilen tek eylem olmuştur.

Covid-19 pandemi mücadelesinde sağlık hizmetleri içinde etkili ve koordine bir eczane destek sistemi ve farmasötik bakım faaliyetlerine ihtiyaç ön plana çıkmıştır. Covid-19 pandemi döneminde toplum eczaneleri, çok fazla insanın başvurması nedeniyle sağlık sistemi içindeki ilk temas noktalarından biridir; potansiyel Covid-19 vakalarının tanımlanmasında ve yönetiminde anahtar rol oynamaktadır. Diğer tüm önde gelen sağlık hizmeti sağlayıcıları gibi, virüse maruz kalma riskine karşı da korunmaları gerekmektedir.

Toplum Eczaneleri, virusün ilk görüldüğü Çin'in Vuhan kentinde gerek virüsün hafif semptomları için kurulan mobil hastanelerde, gerek toplum eczanelerinde halk sağlığı operasyonuna temel destek sağlayarak değerli deneyimler kazanmışlardır. Vuhan kentinde kongre ve sergi merkezleri, spor salonları, fabrika ve depolarda oluşturulan mobil hastanelerin eczanelerinde yeterli sayıda eczacı olmaksızın eczacılar haftada 5-6 gün, günde 8-14 saat çalışarak, yaklaşık 12.000 hastanın tedavisinde temelde şu hizmetleri yerine getirmiştir: Mobil hastanelerde eczane için uygun yer bulmak, gerekli ekipmanı tedarik etmek, Çin Ulusal Sağlık Komisyonu tarafından hazırlanan "Yeni Koronavirüs Enfekte Pnömonisi için Tanı ve Tedavi Kılavuzları" doğrultusunda yaklaşık 100 ilaç içeren ilaç formüllerini derlemek, formüllerdeki ilaçları kataloglamak, stoklamak, reçete destek birimi kurmak ve çalıştırmak [5].

Covid-19 pandemisini önlemek ve yayılımını engellemek için eczane hizmetleri, sağlık hizmetleri arasında önemli bir role sahiptir [6]. Pandemiden etkilenen/etkilenmeyen ülkelerdeki toplum eczaneleri, insanların endişelerini giderme, mevcut güvenilir bilgiye erişim ve hastalıktan korunma noktasında tavsiyeye ihtiyaç duyanlar için sağlık sistemi içinde ilk temas noktasıdır. Çin' de yapılan bir başka çalışmada, eczacıların Covid-19 pandemisindeki başlıca sorumluluklarının; profesyonel hizmet rehberleri hazırlamak, acil ilaç ve dezenfektan formülleri geliştirmek ve hazırlamak, ihtiyaç duyulan tıbbi ürünlerin stoklanmasını sağlamak, insandan insana bulaşları önlemek için uzaktan (internet tabanlı) eczacılık hizmeti sistemleri kurmak, güçlü terapötik bakım, halk arasında enfeksiyonun yayılımını önlemek için eğitimler düzenlemek ayrıca klinik çalışmalara ve ilaç değerlendirmelerine aktif katılım sağlamak olduğu belirtilmiştir [4].

Toplum eczanelerinin mevcut salgın sırasında Covid-19 ile ilgili sağlık endişeleri, güvenilir bilgi ve tavsiye ihtiyacı olan bireyler için sağlık sistemi içindeki ilk temas noktası olduğu kabul edilmektedir [7]. Yakın zamanda yapılan bir çalışma ile eczacıların pandemi gibi çeşitli felaketlere yanıt olarak dört temel aşamada (önleme, hazırlıklı olma, müdahale ve iyileştirme) üstlenebilecekleri çeşitli rolleri tanımlanmıştır [8]. Pandeminin ilk ortaya çıkmasından sonra Çin' deki toplum eczanelerinin yaşadıkları deneyimler, pandemiye küresel yanıtın bir parçası olarak eczacıların rol alabileceklerini ortaya koymuştur. Bu roller arasında kişisel ve çevresel hijyen konusunda halk sağlığı tavsiyelerinin verilmesi, eğitimlerin sağlanması ve şüpheli semptomlar olması durumunda uygun yönlendirmelerin yapılması

bulunmaktadır [9] Yaşanan pandemide acil halk sağığı operasyonlarına destek sağılanması önleyici ve tedavide kullanılan ilaçların zamanında tedarığı, vakaya ve kanıta dayalı farmasötik bakım sağılanması sağılık hizmetlerinde kritik öneme sahiptir.

Toplum eczacılığı uygulamalarının kapsamı ülkeler arasında önemli ölçüde değışiklik göstermektedir [10-13]. Buna rağmen mevcut büyüklükteki bir halk sağığı krizi gibi bazı durumlarda uzmanlık ve profesyonel eğitimleri ile toplum eczacılarının genel uygulamalarda ve hatta acil servisler gibi sağılık hizmetinin diğere alanlarında baskıyı hafifletmeye yardımcı olmak için üstlenebilecekleri rol ve faaliyetlerin de olabileceğı düşünölmektedir [14].

Covid-19 dünya çapında eczacılık uygulamalarında bazı değışiklikler yapılmasına neden olmuştur. Çeşitli ülkelerde, Covid-19 pandemisinin etkilediğı eczacılık hizmetlerine örnekler vermek gerekirse; Amerika Birleşik Devletleri'nin New Mexico eyaletinde, eczacılara reçete hizmet bedeli olarak ücret ödenmesi, özellikle kırsal ve tıbbi olarak yetersiz hizmet alan bölgelerde sağılık hizmetlerine erişimin genişletilmesi ile ilgili tedbirler alınmıştır. Bu tedbirler ile aynı zamanda genel sağılık bakım maliyetlerinin de azalacağı ve eczacıların sürdürülebilir iş modelleri geliştirmede lider olmasının sağılanacağı düşünölmektedir. Hemen hemen her eyaletin birlik ve dernekleri de bu uygulamaya destek vermektedir [15].

Amerikan Eczacıları Birliğı, pandemide eczacıların öncelikle hangi ilaçlara hangi miktarda ihtiyaç duyduğı, ek hasta hacmi ve diğere mevcut hastalıklar karşısında personel ihtiyaçları olup olmadığının belirlenmesini istemiştir. Eczacıların hizmet verme yeteneğini zorlaştıran ana unsurların yeterli ilaç tedarığının olmaması ve değışen tedavi protokolleri olduğı düşünölmektedir. Yeni bilgiler doğırtusunda tedavi algoritmaları sıklıkla güncellenmiştir. Örneğın, tedavide başlangıçta antiviral ilaç olarak lopinavir / ritonavir kullanılırken, daha sonra hidrosiklorokin ve azitromisin kullanılmıştır. Bu tedavi varyasyonlarını kesinleştirmek için hala yeterli klinik kanıt bulunmamaktadır [16].

İngiltere'de toplum eczaneleri, personelin talep etmesi durumunda ulusal sağılık sistemi kapsamında ücretsiz olarak Covid-19 testlerinin yapılacağı sağılık birimleri arasına alınmıştır [17]. Ayrıca, birinci basamakta çalışan sağılık personelleri de dahil olmak üzere tüm sağılık çalışanlarına, ailelerine ve hasta olan yakınlarına bir dizi psikolojik destek düzenlenmiş, kendi sağılık ve refahlarını sürdürmelerinin önemi vurgulanmıştır. Eczane personelinin, bu sağılık desteklerini nasıl alacakları ve testleri nasıl yaptıracakları ile ilgili bilgiler de ayrıntılı bir şekilde ilan edilmiştir [18]. Dağıtım kanalları, gerekli önlemleri alarak hastanede yatış gerektirmeyen Covid-19 hastalarına ilaçlarını ulaştırabilecek bir sistem kurmuştur [19]. Pandemi nedeniyle eczanelerde esnek mesai saatlerine geçilmiştir. Tüm eczanelerin 10:00-12:00 ve 14:00-16:00 saatleri arasında, tatil günlerinde ise belirli saatlerde açık kalması sağılanmıştır. Her eczanenin öğle arası da dahil olmak üzere 2.5 saate kadar kapalı olmasına izin verilmiştir [20]. Ulusal sağılık düzenleyicileri, eczaneler için uyarıcı posterler hazırlayarak eczanelere ulaştırmıştır. Eczaneler için hazırlanan posterler şu mesajları içermektedir:

- Koronavirüs belirtileriniz varsa girmeyiniz!
- Güvenli bir mesafede durunuz! (İnsanlar arasında en az 2 metre mesafe olması gerektiği hatırlatılmalıdır.)
- Belirli zamanlarda hizmet vermiyor olabiliriz (Eczaneler gerek dezenfeksiyon gerekse rutin işler için günün bazı saatleri kapılar kapalı tutularak çalışabilir) [21].

Avrupa Birliği Eczacılık Grubu (Pharmaceutical Group of European Union) pandeminin ilk dönemlerinde yaptıkları açıklamayla, Avrupa Birliği'ndeki toplum eczacılarının koronavirüs hastalığına karşı mücadelede ön saflarda yer aldıklarını ve hastaların eczacılık hizmetlerini en iyi şekilde alabilmeleri için ellerinden gelen her şeyi yaptıklarını belirtmiştir. Eczacıların pandemi döneminde hastaların ihtiyaçlarını karşılama ve hizmetlerin sürekliliğini sağlama konusundaki profesyonellikleri ve mesleğe bağlılıkları herkes tarafından takdir edilmektedir. İtalya' da özellikle kızılhaç eczaneleri aracılığı ile eczaneye ulaşamayan insanların ilaçları evlerine teslim edilmiştir. Finlandiya' da toplum eczaneleri ilk iş olarak kendi kullanımları için el dezenfektan jelleri üretmiş; daha sonra halkın dezenfektan ihtiyacına destek olmuşlardır. Eczanelerin hem dışına hem içine el dezenfektanları konması gibi çeşitli tedbirleri eczacıların kendi çabaları ile aldıkları ifade edilmektedir [22].

Tüm Dünya'da olduğu gibi ülkemizde de toplum eczacıları en kolay ulaşılabilen sağlık personelidir [23]. Covid-19 pandemi sürecinde sağlık sisteminin ön saflarında yer alan eczacılar ve eczacılık mesleği için yeni kazanımların tartışılması gerekmektedir.

Türkiye'de 01.10.2020 tarihi itibarıyla doğrulanmış toplam koronavirüs hasta sayısı 320.070, toplam iyileşen hasta sayısı 281.151, toplam ölüm ise bu tarihe kadar 8262 olarak bildirilmiştir [24]. Tüm dünyada aynı tarihte toplam vaka sayısı 34.545.578, toplam ölüm sayısı ise 1.027.138 olmuştur [25].

Türkiye' de ilk Covid-19 vakası 11 Mart 2020' de saptanmıştır. Türkiye Cumhuriyeti hükümeti daha önce bir benzeri yaşanmamış bu pandemiyle son derece sistematik tedbirler alarak mücadele etmektedir; ancak, bu genel tedbirler altında her meslek kendi koruyucu önlemlerini almak zorunda kalmıştır. Küresel ölçekte insan yaşamını derinden etkileyen Covid-19 pandemisi ile sağlık sisteminde birinci basamak sağlık hizmet sunucusu olarak 7/24 kesintisiz hizmet veren toplum eczanelerinin önemi ve vazgeçilmezliği tartışmasız bir şekilde kabul edilmiştir. Ayrıca ülkemizde koronavirüs hastalığından yaşamını kaybeden ilk sağlık mesleği mensubunun bir toplum eczacısı olduğu hükümet yetkililerince açıklanmıştır.

Türkiye'de toplum eczaneleri uygulamaları için pandemi sürecinde birtakım düzenlemeler yapılmıştır. Kronik hastalığı olan hastalara bir sağlık kuruluşuna gidip hekime muayene olmaksızın toplum eczacılarına devam reçetelerini yazma yetkisi verilerek hastaların ilaçlarını doğrudan eczanelerden alabilmeleri sağlanmıştır. Eczanelerde maske satışı yapılıyorken satış yapılması durdurulmuş; hükümet halka ücretsiz maske dağıtım görevini toplum eczacılarına vermiştir. Bu durum, eczaneye gelen kişi sayısının normalin çok üstüne çıkması dolayısıyla temasın artmasına neden olmuştur.

Sonraki süreçte ücretsiz maske dağıtımı uygulamasından vazgeçilerek maskelerin belirlenmiş bir azami ücret karşılığında her yerde satışının yapılabilmesine onay verilmiştir. 65 yaş ve üstü, 20 yaş ve altına yaklaşık 3 ay boyunca sokağa çıkma yasağı uygulanırken; bu yaş gruplarındaki hastaların ilaçlarına ulaşması merkezi yönetim tarafından oluşturulmuş vefa destek grupları aracılığıyla sağlanmıştır. Bu gruplar, belirlenen eczanelerden ilaçları alarak hastalara ulaştırmıştır. Eczane çalışma saatleri düzenlenmiş, sokağa çıkma yasağı olan günlerde bile tüm eczaneler açık kalmıştır.

Türk Eczacıları Birliği'nden alınan verilere göre Türkiye'de 2020 yılı Mart ayı itibarıyla 26.748 toplum eczanesi bulunmaktadır. Toplum eczaneleri, hastaların ilaç ve ilaçla ilgili bilgi ihtiyaçlarını karşılamak üzere bir eczacı mesul müdürün sorumluluğunda açılan ve Sağlık Bakanlığı'nın 31 Mayıs 2019 tarih ve 2019/10 sayılı genelgesi ile birinci basamak sağlık kuruluşu olarak tanımlanan, halkın sağlıkla ilgili her türlü probleminde başvurabilecekleri kuruluşlardır [26]. Eczacılık mevzuatı gereği bu eczanelerde ikinci eczacı, yardımcı eczacı ve eczane destek personelleri görev yapmakta olup yaklaşık 100.000 kişi istihdam edilmektedir.

Bu çalışma, Türkiye'deki toplum eczanelerinde verilen eczacılık hizmetlerine Covid-19 pandemi sürecinin etkilerini ortaya koymak üzere yapılmıştır. Bu çalışma ile toplum eczacılarının pandemi ile mücadelede hangi tedbirleri aldıkları, pandemi sırasında kişisel koruyucu ekipman tedariği noktasında sorun yaşayıp yaşamadıkları, ayrıca; personelin çalışma koşulları ve istihdamı yanında eczacıların bu süreçte içinde buldukları ekonomik durum, yaşadıkları zorluklar ve bu zorlukların çözümü için hangi yöntemlere başvurdukları ortaya konmaya çalışılmıştır. Çalışma ile pandemi sürecinde,

- Toplum eczacılarının sorunlarının tespit edilmesi,
- Eczacıların, istihdam ettikleri personellerinin ve eczaneye gelen hastaların sağlığını koruyucu tedbirleri nasıl alabileceklerinin belirlenmesi,
- Majistral ve müstahzar ilaçların hastalara ulaştırılmasında sürekliliğin sağlanması için öneriler verilmesi ve
- Toplum eczaneleri için alınabilecek ekonomik tedbirlerin belirlenmesi hedeflenmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma tanımlayıcı nitelikte olup; araştırmada niceliksel araştırma tipinde araştırmacılar tarafından hazırlanan anket formu kullanılmıştır. Araştırmaya başlamadan önce Ankara Üniversitesi Etik Kurulu ve Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Bilimsel Araştırma Platformu'na başvuru yapılmış, ilgili kurullarca araştırmanın yapılması etik açıdan uygun bulunmuştur. Anket formları, çalışmanın pandemi döneminde yapılması nedeniyle online olarak gönüllülere ulaştırılmıştır. Türkiye'nin tüm bölgelerindeki gönüllülere ulaşılabilmesi amacıyla toplum eczacılarının yer aldığı sosyal medya

platformlarında belirli aralıklarla anket linki paylaşılmış, aydınlatılmış onam formu ile katılımcılar bilgilendirilerek onay vermeleri halinde araştırmaya katılmışlardır.

Türkiye’de bulunan 26.748 eczaneyi temsil edecek örneklem çapı, 0.10 örnekleme hatası ve 0.5 gerçekleşme olasılığı ile 96 olarak belirlenmiştir [27]. Anket için hazırlanan sorular hakkında uzman görüşü alınmış ve ön uygulama yapılmıştır [28]. Anket sonucu elde edilen veriler sayı ve yüzdelerle ifade edilmiştir.

Toplum eczacılarına yapılan anket soruları içinde, eczacıların ve hastaların ihtiyaçlarının belirlenmesi, pandemi döneminde eczacılık hizmetlerinin zayıf ve güçlü yanlarının saptanması, iyileştirme ve geliştirmeye açık alanların tespiti, var olan politikaların ve programların etkinliklerinin ölçümü ile ilgili sorular yer almaktadır. Toplum eczanelerinin herhangi bir salgın durumunda hastaların ilk başvuracağı sağlık kuruluşu olmaları nedeniyle gerekli önlemler alınmadığında salgının yayılım merkezi olabileceği tüm dünyanın kabul ettiği bir gerçektir. Dolayısı ile eczanelerde salgın hastalıklarla mücadelede öncelikle önlem alınması, toplum sağlığı açısından çok önemlidir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Genel Bilgiler

Araştırmaya 137 toplum eczacısı katılmıştır. Katılımcılara ilişkin genel bilgiler Tablo 1’de gösterilmektedir. Tablo 1’den anlaşılacağı üzere araştırmaya katılan toplum eczacılarının büyük bir kısmı (yaklaşık %75’i) kent merkezlerinde çalışmaktadır. Yakınında sağlık tesisi (aile sağlığı merkezi ve hastane) bulunan eczanelerde hizmet veren eczacılar ise araştırmaya katılan eczacıların yarısından fazlasını oluşturmaktadır.

Tablo 1. Çalışmaya Katılan Eczacıların Demografik Bilgileri Dağılımı

Cinsiyet	Erkek	Kadın			
	62 (%45.3)	75 (%54.7)			
Yaş	20-29	30-39	40-49	50-59	60 ve üzeri
	13 (%9.5)	44 (%32.1)	38 (%27.7)	28 (%20.4)	14 (%10.2)
Eczanenin Bulunduğu Yer	İl	İlçe	Köy		
	102 (%74.5)	32 (%23.4)	3 (%2.2)		
Eczanenin Konumu	Aile Sağlığı Merkezi yakını	Ahişveriş Merkezi	Cadde üzeri	Hastane karşısı	Semt
	55 (%40.1)	4 (%2.9)	32 (%23.4)	16 (%11.7)	30 (%21.9)
Eczanenin Aynı Konumda Hizmet Verme Süresi	0-5	6-15	16 ve üzeri		
	39 (%28.5)	55 (%40.1)	43 (%31.4)		

Güvenilir Bilgiye Erişim

Bir salgın sırasında, bireyler salgınla ilgili zamanında, yetkili ve bilimsel bilgilere erişemediğinde yanlış bilgi ve söylentiler ciddi olumsuz etkiler yaratabilir [29]. Halkı doğru bilgilendirmek öncelikle sağlık personellerinin görevidir. Bu anlamda birinci basamak sağlık kuruluşu sınıfında yer alan toplum eczanelerine önemli sorumluluklar düşmektedir. Ülkemizde de pandemi döneminde toplum eczacılarının öncelikle doğru ve en güncel bilgilere erişmesi, sonrasında ise edindikleri bu bilgileri toplum ile paylaşmaları kritik öneme sahiptir.

Pandemi ile mücadelede ülkelerin kendilerine ait acil durum eylem planlarının olması ve olası salgın durumlarında bu plana göre hareket edilmesinin de önemli olduğunu gösteren araştırmalar bulunmaktadır [30, 31]. Bu planlarda genel olarak pandemiye hazır olmak, pandemi planlarında esneklik ve süreç içerisinde ortaya çıkması muhtemel diğer halk sağlığı problemleri için de hemen aksiyon alınabilmesi için acil durum eylem planlarının sürekli olarak gözden geçirilmesi gerekliliği vurgulanmaktadır [32].

Ülkemizdeki toplum eczacılarının pandemi ile ilgili bilgilere erişmek için başvurdukları bilgi kaynakları Tablo 2’de gösterilmektedir.

Tablo 2. Çalışmaya Katılan Eczacıların Başvurdukları Bilgi Kaynaklarının Dağılımı

Toplum Eczacıları Tarafından Başvurulan Kaynaklar	
Mesleki Bilgiler	17 (%12.4)
Bilimsel Makaleler	87 (%63.5)
Meslek Örgütünün Hazırladığı Bildiriler	13 (%9.5)
Uluslararası Eczacılık Federasyonu (FIP) Kılavuzları	6 (%4.4)
Sağlık Bakanlığı Kılavuzları	5 (%3.7)
DSÖ Kılavuzları	9 (%6.6)

Tablo 2’den anlaşılacağı üzere toplum eczacıları güncel bilgilere erişebilmek adına farklı bilgi kaynaklarını kullanmaktadır. Bu kaynaklardan en çok göze çarpan ise bilimsel makaleler olmuştur. Herhangi bir bilgi kaynağını kullanmayıp mesleki bilgileri ile hareket eden toplum eczacıları ise %12’lik dilimi oluşturmuştur.

Çalışmaya katılan toplum eczacılarının çok büyük bir kısmı acil durum eylem planı hazırlanması gerekliliğini belirtmiştir. Özellikle içinde bulunduğumuz pandemi dönemi, olağanüstü durumlar (deprem, sel, pandemi, epidemi vb.) için önlem, hazırlık ve planlama gibi organizasyonel faaliyetleri barındıran ulusal bir eylem planı hazırlanması gerektiğini göstermektedir.

Toplum eczacılarının, hastalar ve diğer sağlık hizmeti sağlayıcıları için değerli bir bilgi kaynağı olduğu; yeni bilgi teknolojisinin, özellikle de internetin ortaya çıkışı nedeniyle yeni sağlık hizmeti bilgilerine hızlı erişilebilirlikle birlikte bu bilgi kaynağına talebin daha da arttığı bilinmektedir [33]. Pandemi sürecinde ülkemizde de halk, koronavirüs hastalığı ile ilgili olarak korunma ve bulaş yolları, belirtileri, tedavisi, tedavide kullanılan ilaçlar gibi birçok konuda toplum eczacılarına başvurmaktadır.

Tablo 3'te toplum eczanelerine başvuran hastaların koronavirüs hastalığına dair hangi konularda danışmanlık bekledikleri görülmektedir.

Tablo 3. Toplum Eczanelerine Başvuran Hastaların Danışmanlık Bekledikleri Konuların Dağılımı

Hastalıktan korunma yolları	104 (%76.5)
Hastalığın bulaş yolları	81 (%59.6)
Hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar	81 (%59.6)
Hastalık belirtisi olanların nereye/nasıl başvuracakları	61 (%44.9)
Anjiotensin Reseptör Blokörü, Anjiotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörü ve diğer antihipertansif ilaçlardan kullanan hastaların Covid-19 virüsüne daha duyarlı olup olmadığı	48 (%35.3)
İbuprofen kullanan hastaların Covid-19 virüsüne daha duyarlı olup olmadığı	84 (%61.8)
Hidroksiklorokinin koruyucu olarak kullanımı	93 (%68.4)
İmmün sistemi güçlendirici ilaç/besin takviyeleri	118 (%86.8)

Tablo 3'ten anlaşılacağı üzere toplum eczacıları birçok konuda hastalara danışmanlık vermektedir. Bu bilgiler hastalar ile paylaşılırken büyük bir kısım herhangi bir bilgilendirme materyaline ihtiyaç duymadıklarını belirtmiştir. Bilgilendirme materyaline ihtiyaç duyma durumu ile cinsiyet ($p=0.312$), yaş ($p=0.130$), eczanenin konumu ($p=0.696$) ve eczanenin aynı konumda hizmet verme süresi ($p=0.648$) arasında istatistiksel açıdan bir ilişki bulunamamıştır.

Koruyucu Önlemler

Koronavirüs enfeksiyonu, ateş, nefes darlığı ve öksürük ile karakterize, yüzeyden yüzeye ve hava yoluyla bulaşabilen bir hastalıktır. Hem canlı hem de cansız yüzeyler, Covid-19 enfeksiyonunun yayılmasında önemli bir rol oynayabilmektedir. Covid-19 hastalığının yayılımını durdurmak için önleyici bakım oldukça önemlidir. Mevcut bilgiler kişisel koruyucu ekipman (maske, eldiven, siperlik vb.) ve yüzey dezenfektanı kullanımı, el hijyeni ve sosyal mesafe gibi uygulamaların Covid-19 enfeksiyonlarının küresel yayılabilirliğini sınırlayan en kritik yöntemler olduğunu vurgulamaktadır [34].

Ülkemizdeki toplum eczacıları da pandemi sürecinde gerek kendileri ve personelleri gerekse eczaneye gelen hastalar için bazı koruyucu tedbirler almıştır. Toplum eczacılarının almış oldukları kişisel ve mekânsal önlemler Tablo 4 ve Tablo 5'te, bu önlemler alınırken karşılaşılan sorunlar ise Tablo 6'da gösterilmektedir.

Tablo 4. Pandemi Sürecinde Eczacıların Almış Olduğu Kişisel Önlemlerin Dağılımı

Alınan Kişisel Önlem	
Maske	136 (%99.3)
Eldiven	98 (%71.5)
Gözlük	85 (%62)
Siperlik	95 (%69.3)
Tulum	37 (%27)

Tablo 5. Pandemi Sürecinde Eczacıların Almış Olduğu Mekansal Önlemlerin Dağılımı

Alınan Mekansal Önlemler	
Eczane içinde bulunabilecek alanın belirlenmesi	96 (%70.1)
Eczanenin içinin şeffaf malzeme ile kaplanması	37 (%27)
Hastalara kapıdan hizmet verilmesi	51 (%37.2)
Eczane içindeki oturma alanlarının kaldırılması	81 (%59.1)
1,5 metrelik sosyal mesafenin korunması için yerlere şerit yapıştırılması	69 (%50.4)

Tablo 6. Pandemi Sürecinde Eczacıların Önlemler Alırken Karşılaştıkları Sorunların Dağılımı

Toplum Eczanelerinde Koruyucu Önlemler Alırken Karşılaşılan Sorunlar	
Alınması gerekli önlemler ile ilgili bilgilere ulaşmakta sorun	22 (%17.3)
Gerekli ekipmanların piyasada bulunamaması	41 (%32.3)
Gerekli ekipmanların temininde fiyat yüksekliği nedeniyle zorluk	77 (%60.6)
Gerekli ekipmanların temininin sürdürülmesinde fiyat yüksekliği nedeniyle zorluk	77 (%60.6)
Dağıtım Kanallarının ekipman ihtiyacının devamlılığını sürdürememesi	62 (%48.8)

Ürün Tedariği

Pandemi sırasında halk, düzenli kullandıkları ilaçları, Covid-19 hastalığından korunmada kullanılan (maske, dezenfektan gibi) ve bağışıklığı güçlendirici (vitaminler gibi) ürünleri ihtiyaç duydukları miktarlarda tedarik etmek için çoğunlukla toplum eczanelerine güvenmektedir. İlaçlar ve bahsi geçen diğer ürünler, pandeminin kontrolü ve kronik hastalıkların yönetimi için çok önemlidir [35]. Toplum eczaneleri, FIP'in Covid-19 salgını için "Eczacılar ve Eczane İşgücü için Bilgiler ve Geçici Kılavuzlar" bölümünde önerdiği gibi "talebi karşılayacak uygun farmasötik ürün stokları" tutmak durumundadır [7]. Buradan hareketle toplum eczacılarının pandemiye hazırlanırken ve pandemi sürecinde ürün tedarikiğine önem vermeleri gerektiği anlaşılmaktadır. Ülkemizde pandemi sürecinde toplum eczanelerine başvuran kişilerin hangi ürünleri talep ettiği Tablo-7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Pandemi Sürecinde Toplum Eczanelerinden En Fazla Talep Edilen İlaç ve Ürünlerin Dağılımı

Pandemi Sürecinde Toplum Eczanelerinden En Fazla Talep Edilen İlaçlar/Ürünler	
Ateş düşürücü ilaçlar	59 (%44)
Mukolitik ilaçlar	40 (%29.9)
Öksürük kesici ilaçlar	34 (%25.4)
Bağışıklığı güçlendirici gıda takviyeleri	123 (%91.8)
Covid-19 tedavi protokollerinde yer alan ilaçlar (hidroksiklorokin, antiviraller, antibiyotikler vb.)	66 (%49.3)
Vitaminler	108 (%80.6)

Tablo 7'den anlaşılacağı üzere en çok talep, bağışıklığı güçlendirici gıda takviyeleri ve vitamin içeren ürünlere olmuştur. Toplum eczaneleri tarafından talep edilen ürünler ise dağıtım kanallarınca büyük ölçüde zamanında teslim edilmiş olsa da teslim zamanı ile ilgili olarak sorun yaşıyan toplum eczanesi oranı (%43) da azımsanmayacak niceliktedir. Buradan hareketle, dağıtım kanallarının tedarik zincirlerini gözden geçirip talep edilen ürünleri en kısa sürede toplum eczanelerine ulaştırmayı sağlayan lojistik yapıyı kurmaları gerekmektedir. Kişisel koruyucu ekipman temini ise ayrıca irdelenmesi gereken bir konudur. Koronavirüs hastalığından korunmada maske, siperlik, tulum gibi ekipmanların kullanımı

toplum eczacıları için oldukça önemli olmasına rağmen bu ekipmanların temininde gerek talep edilen ürünlerin piyasada bulunamaması gerek de ekipmanların yüksek fiyatlı olmaları toplum eczacıları tarafından önemli sorunlar olarak belirtilmiştir. Pandemi sürecinde talep edilen ürünlerin dağıtım kanalları tarafından zamanında teslim edilme durumu ile cinsiyet ($p=0.259$), eczanenin konumu ($p=0.081$) ve aynı konumda hizmet verme süresi ($p=0.070$) bakımından ilişki bulunamamış ancak eczacının yaşı ile teslim süresi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p=0,004$).

Pandemi Döneminde Yeni Uygulamalar

Pandemi döneminde eczacılık hizmetlerinde tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de bazı yeni uygulamalar göze çarpmaktadır. Pandeminin ilk dönemlerinde yeterli maskenin piyasada bulunamaması ve yüksek maliyetli olması, 65 yaş üstü ve 20 yaş altı kişilere uygulanan sokağa çıkma yasakları nedeniyle bu yaş gruplarındaki hastaların ilaçlara erişiminde sorun yaşamaları bazı yeni uygulamaları gündeme getirmiştir. Maskelerin ücretsiz bir şekilde vatandaşlara gönderilen kodlarla toplum eczanelerinden verilmesinin yanı sıra raporlu ilaçların devam reçetelerinin hastaların herhangi bir sağlık kuruluşuna gitmeksizin eczaneler tarafından düzenlenen devam reçeteleriyle verilmesi bu uygulamalardandır. Bu uygulamalara yönelik olarak toplum eczacılarının görüşleri Tablo 8 ve Tablo 9 'da verilmektedir.

Tablo 8. Toplum Eczanelerinden Ücretsiz Maske Dağıtımını Konusundaki Görüşlerin Dağılımı

Maskeler en hijyenik şekilde eczanelerden dağıtılabilir.	50 (%37)
Eczanelere yeterince maske gelmemiştir.	36 (%26.7)
Maskeler gelmeden vatandaşlara ilgili kodlar gitmiştir.	62 (%45.9)
Maskeler kutularda 5' li ambalaj olmadan gelmiş; bu nedenle maskelerin hijyenitesi risk altında kalmıştır.	109 (%80.7)
Eczanelere başvuran kişi sayısının artmasına neden olmakta dolayısıyla bulaş riski yükselmektedir.	107 (%79.3)
Eczanelerdeki iş yükü artmakta, eczacılık hizmetlerinde aksamalara neden olabilmektedir.	104 (%77)

Tablo 9. Hastaların Eczanelerden Taleplerini Karşılama Üzere Yeni Bir Düzenleme Yapılması Gerekliliği İle İlgili Görüşlerin Dağılımı

Evet	72 (%52.6)
Hayır	65 (%47.4)

Tablo 8'den anlaşılacağı üzere, toplum eczanelerinden ücretsiz maske dağıtımını uygulanmasında bazı önemli sorunlar yaşanmıştır. Maskelerin eczanelere ulaşmadan ilgili kodların vatandaşlara gelmesinin ve maskelerin 5'li ambalajlar halinde paketli durumda olmamasının eczacıların iş yükünü arttırdığı; ayrıca maske hijyeninde sorunlar oluşturduğu belirtilmiştir. Ücretsiz maske uygulamasındaki en kritik nokta, eczaneye başvuran kişi sayısının artması dolayısıyla bulaş riskinin artması ve eczacılık hizmetlerinde bazı aksamaların olma ihtimalidir. Maske almak üzere eczaneye başvuran kişilerin üçte birinin Covid-19 hastası olması ise bu riski gözler önüne sermektedir.

Ülkemizdeki ilgili yasa ve yönetmelikler gereği hastalar/kişiler ihtiyaç duydukları ilaç, tıbbi malzeme ve kozmetikleri toplum eczanelerinden temin etmektedirler; eczanelerin ilaç ve kozmetikleri bu kişilerin buldukları yerlere teslim etmeleri gibi bir durum söz konusu olmamaktadır. Ancak pandemi dönemindeki tedbirler nedeniyle sokağa çıkması yasaklanan kişilerin ilaçları, oluşturulan destek grupları aracılığıyla eczanelerden alınarak ilgili hasta kişilere ulaştırılmıştır. Araştırmaya katılan toplum eczacılarının çoğu, Tablo 9'dan da anlaşılacağı üzere mevzuatta böyle bir uygulama olmamasına rağmen eczacılık hizmetlerini ilgilendiren yasa ve yönetmeliklerde bu konu ile ilgili olarak bazı değişiklikler yapılması gerektiğini belirtmiştir. Hastaların eczanelerden taleplerini karşılamak üzere yeni bir düzenleme yapılması gerekliliği hakkındaki düşüncelerle ilgili olarak yaş ($p=0.026$), cinsiyet ($p=0.406$), eczanenin konumu ($p=0.879$) ve aynı konumda hizmet verme süresi ($p=0.120$) arasında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

İş Yüğü

Pandemi döneminde hayata geçirilen yeni uygulamalar, toplumun kişisel koruyucu ekipman ve bazı ilaç ve gıda takviyelerine olan artan talebinin yanı sıra Covid-19 hastalığına yakalanan ya da hasta biriyle temas etmiş olan eczane personelinin iş gücü kaybı nedeniyle toplum eczanelerinin iş yükü büyük ölçüde artmıştır. Tablo 10 ve Tablo 11'de toplum eczanelerinin iş yükünün artma nedenleri ve personel ihtiyaçlarına yönelik görüşleri verilmiştir.

Tablo 10. Çalışmaya Katılan Eczacıların İş Yükünü Arttıran Nedenlerin Dağılımı

Reçete Sayısı	14 (%11.1)
İlaç ve gıda takviyelerine talep	61 (%48.4)
Kişisel koruyucu ekipman ve hijyen malzemelerine talep	99 (%78.6)
Ücretsiz maske dağıtımı	122 (%96.8)

Tablo 11. Çalışmaya Katılan Eczacıların Personel İhtiyaçlarına Yönelik Görüşlerinin Dağılımı

Pandemi sürecinde personelin çalışmak istememesi	8 (%5.8)
Artan iş yükü nedeniyle personel ihtiyacının doğması ancak ekonomik koşullar nedeniyle istihdam edilememesi	37 (%27)
Artan iş yükü nedeniyle yeni personel istihdam zorunluluğu	5 (%3.6)
Pandemi sürecinde mevcut personelin yeterli olması	87 (%63.5)

Tablo 10 ve Tablo 11'den anlaşılacağı üzere iş yükünün artmasının en önemli nedeni, toplumun Covid-19 hastalığından korunmak üzere ihtiyaç duyduğu koruyucu ekipman (maske, eldiven vs.) ve dezenfektan gibi hijyen malzemelerine artan taleptir. Artan iş yüküne karşılık araştırmaya katılan toplum eczacılarının %27'si yeni personel istihdam etmek istemiş ancak ekonomik koşulları elvermediği için başarılı olamamıştır.

Mali Durum

Covid-19 pandemisi ekonomik açıdan tüm sektörleri etkilemiştir. Pandeminin kontrol altına alınması, çalışanların gelirlerinin devam ettirilmesi ve işletmelerin olası zararlarının asgariye indirilmesi büyük önem taşımaktadır [36]. Bu süreçte toplum eczacılarının ekonomik sorun yaşama durumu ve gelirlerindeki değişiklikleri içeren veriler Tablo 12 ve Tablo 13’de gösterilmektedir.

Tablo 12. Çalışmaya Katılan Eczacıların Ekonomik Sorun Yaşama Durumlarının Dağılımı

Evet	61 (%44.5)
Hayır	76 (%55.5)

Tablo 13. Çalışmaya Katılan Eczacıların Gelirlerindeki Değişikliklerin Dağılımı

Artan	21 (%15.3)
Azalan	72 (%52.6)
Değişiklik olmayan	44 (%32.1)

Tablo 12 ve Tablo 13’ten anlaşılacağı üzere araştırmaya katılan toplum eczacılarının yarısından fazlası pandemi sürecinde gelirinin azaldığını; yarısına yakını ise ekonomik sorun yaşadığını belirtmiştir. Bu durum karşısında ekonomik veya sosyal destek alan toplum eczacısı sayısı ise oldukça azdır. Çalışmaya katılan eczacıların ekonomik sorun yaşama durumları ile yaş ($p=0.849$), cinsiyet ($p=0.241$), eczanenin konumu ($p=0.131$) ve aynı konumda hizmet verme süresi ($p=0.634$) arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Araştırma sonuçlarından hareketle, ülkemizdeki toplum eczacılarının pandemi sürecinde büyük bir özveriyle eczacılık hizmetlerini verdikleri ancak aynı zamanda birçok sorunla da başa çıktıkları anlaşılmaktadır. Özellikle, maskelerin ücretsiz olarak toplum eczaneleri aracılığıyla verilmesi eczacıların iş yükünü artırarak eczacılık hizmetlerinde bazı aksamalara neden olmuş, buna ek olarak vatandaşların maske almak üzere eczanelerde yoğunluk oluşturması mesafenin korunamaması riskini doğurarak bulaş ihtimalini de arttırmıştır.

Toplum eczacıları, kişisel koruyucu ekipman tedarikinde ciddi zorluklar yaşamış; gerek ihtiyaç duyulan ekipmanın piyasada bulunamaması gerekse yüksek maliyet nedeniyle bu ekipmanlara yeterince erişememiştir. Pandemi döneminde uygulanan kısıtlamalar sosyoekonomik açıdan her sektörü etkilediği gibi toplum eczanelerini de etkilemiş, eczacılar mali açıdan zor bir durumda kalmıştır. Buna karşın toplum eczacıları herhangi bir kurum ya da kuruluştan destek alamamış, öz sermayeleri ile işletmelerini ayakta tutmaya çalışmıştır.

Toplum eczaneleri halkın rahatlıkla güvenilir bilgiye erişebildiği sağlık kuruluşlarıdır. Pandemi sürecinde toplum eczacıları ile hastalıktan korunma, tedavi ve bulaş yolları gibi konularda güncel bilgilerin aktarılması konusunda gerek ülkemizdeki sağlık otoritesi olan Sağlık Bakanlığı gerekse meslek

örgütünün bu bilgileri hızla aktarması, hastalıkla ilgili en doğru bilgilerin toplumla paylaşılması noktasında önem arz etmektedir.

Yakın dönemde bir benzeri yaşanmamış büyüklükteki bu pandemiyle mücadelede ulusal bir acil durum eylem planı varlığının toplum eczacıları için yol gösterici olacağı düşünülmektedir. Pandemi ya da doğal afetler gibi olağan dışı durumlarda toplum eczacılarının eczacılık hizmetlerini yerine getirebilmeleri amacıyla ihtiyaç duydukları tıbbi ürün ve ekipmanları nasıl tedarik edebileceklerinin yanı sıra gerektiğinde mobilize olabilmeleri ve hangi koşulda olursa olsun mesleki bilgilerini toplumun ihtiyaçları için kullanabilmeleri toplum sağlığı için oldukça önemlidir.

Sonuç olarak, koronavirüs hastalığının 11 Mart 2020' de DSÖ tarafından bir pandemi olarak ilan edilmesinden sonra benzeri görülmemiş nitelikte ve ölçekte küresel bir sağlık krizi başlamıştır [37]. Ülkelerin salgına verdikleri tepki, strateji türü ve uygulanan adımların zamanlamasında da farklılıklar görülmüştür. Uygulanan yaklaşım ne olursa olsun, toplum eczacılarının sağlık hizmetlerinin sunulmasında etkin role sahip olduğu dünyaca kabul edilmiştir [38]. Toplum eczaneleri pek çok ülkede ulusal düzeyde temel sağlık hizmeti sunucusu olarak tanımlanmış; bazı ülkelerde eczanelerin tüm hafta boyunca açık kalması sağlanarak eczacılık hizmetleri kamuya açık ve erişilebilir kalan birkaç hizmetten biri haline gelmiştir [39, 40].

Bu çalışmada toplum eczacılarının Covid-19 pandemi süresince başlıca yaşadığı sorunlar; özellikle kişisel koruyucu ekipman ve hijyen malzemelerine talebin fazla olması nedeniyle iş yükünün artması, personel ihtiyacı, hastalıktan korunmak için kendi imkanları ile tedbir almaları, toplumun pandemi süresince ihtiyaç duyduğu ilaç ve ürünlerin dağıtım kanalları tarafından zamanında teslim edilmemesi, maskelerin topluma ücretsiz dağıtım sürecinde çok fazla kişi ile temas etmek durumunda kalmaları ve özellikle ekonomik sorun yaşayan eczacıların ekonomik ve/veya sosyal destek alabilecekleri kurum veya kuruluşların olmaması olarak ortaya çıkmıştır.

Eczacılık mesleğinin pandemi gibi durumlar karşısında daha etkin yanıt verebilecek şekilde nasıl donatılabileceğinin analiz edilmesi gerekmektedir. Yapılan çalışmalar, eczane çalışanlarının büyük bir kısmının daha önce küresel bir sağlık acil durumuna aktif olarak dahil olmadığını ve acil durumlara hazırlıklı olmak konusunda eğitim almadıklarını göstermektedir [41]. Bu durumla başa çıkabilmek için öncelikle eczacılık eğitim müfredatlarına pandemi ve doğal afet yönetiminde eczacının rolüne yönelik derslerin konması önerilmektedir. Eczacıların kolay ulaşabileceği kaynaklar yaratmanın önemli olduğu; özellikle Covid-19 ile ilgili konularda web ortamında seminerlerin düzenlenmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca, eczacıların sorun ve endişelerini giderebilmek adına bir destek topluluğu oluşturulması eczacılar için önemli bir kazanım olacaktır.

YAZAR KATKILARI

Kavram: G.Ö.; Tasarım: M.Ç., G.G., G.Ö.; Denetim: G.G., G.Ö.; Kaynaklar: M.Ç., G.Ö.; Malzemeler: M.Ç., G.G., G.Ö.; Veri toplama ve/veya işleme: M.Ç., G.Ö.; Analiz ve/veya yorumlama: M.Ç., G.G., G.Ö.; Literatür taraması: M.Ç., G.Ö.; Makalenin yazılması: M.Ç., G.Ö.; Kritik inceleme: G.G., G.Ö.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Healthline Web Site. (2020). Retrieved September 11, 2020, from <https://www.healthline.com/health-news/what-does-it-mean-to-declare-a-pandemic>
2. Pharmacy Today Web Site. (2020). Retrieved September 13, 2020, from [https://www.pharmacytoday.org/article/S1042-0991\(20\)30296-6/fulltext](https://www.pharmacytoday.org/article/S1042-0991(20)30296-6/fulltext)
3. Han, Q., Lin, Q., Jin, S., You, L. (2020). Coronavirus 2019-nCoV: A brief perspective from the front line. *Journal of Infection*, 80(4), 373-377. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.02.010>
4. World Health Organization Web Site. (2020). Retrieved September 11, 2020, from <https://www.who.int/bulletin/volumes/89/7/11-088815/en/>
5. Meng, L., Qiu, F., Sun, S. (2020). Providing pharmacy services at cabin hospitals at the coronavirus epicenter in China. *International Journal of Clinical Pharmacy*, 42, 305-308. <https://doi.org/10.1007/s11096-020-01020-5>
6. Pharmacy Today Web Site. (2020). Retrieved September 13, 2020, from [https://www.pharmacytoday.org/article/S1042-0991\(20\)30348-0/fulltext](https://www.pharmacytoday.org/article/S1042-0991(20)30348-0/fulltext)
7. International Pharmaceutical Federation Web Site. (2020). Retrieved September 15, 2020, from <https://www.fip.org/coronavirus>
8. Watson, K.E., Singleton, J. A., Tippett, V., Nissen, L.M. (2019). Defining pharmacists' roles in disasters: A Delphi study. *PloS one*, 14(12), e0227132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227132>
9. Ung, C.O.L. (2020). Community pharmacist in public health emergencies: quick to action against the coronavirus 2019-nCoV outbreak. *Research in Social and Administrative Pharmacy*, 16(4), 583-586. <https://doi.org/10.1016/j.sapharm.2020.02.003>
10. Hughes, C.M., Hawwa, A.F., Scullin, C., Anderson, C., Bernsten, C. B., Björnsdóttir, I., Cordina, M.A., Costa, F.A.C., Wulf, I., Eichenberger, P., Foulon, V., Henman, M.C., Hersberger, K.E.,

- Schaefer, M.A., Søndergaard, B., Tully, M.P., Westerlund, T., McElnay, J.C. (2010). Provision of pharmaceutical care by community pharmacists: A comparison across Europe. *Pharmacy World and Science*, 32(4), 472-487. <https://doi.org/10.1007/s11096-010-9393-x>
11. Aly, M., García-Cárdenas, V., Williams, K., Benrimoj, S.I. (2018). A review of international pharmacy-based minor ailment services and proposed service design model. *Research in Social and Administrative Pharmacy*, 14(11), 989-998. <https://doi.org/10.1016/j.sapharm.2017.12.004>
 12. Cope, L.C., Abuzour, A.S., Tully, M.P. (2016). Nonmedical prescribing: Where are we now? *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 7(4), 165-172. <https://doi.org/10.1177/2042098616646726>
 13. Eczacılar ve Eczaneler Hakkında Yönetmelik. T.C. Resmi Gazete, 12 Nisan 2014, sayı: 28970.
 14. Cadogan, C.A., Hughes C.M. (2021). On the frontline against COVID-19: Community pharmacists' contribution during a public health crisis. *Research in Social and Administrative Pharmacy*, 17(1), 2032-2035. <https://doi.org/10.1016/j.sapharm.2020.03.015>
 15. Pharmacist Web Site. (2020). Retrieved September 15, 2020, from <https://www.pharmacist.com/article/new-mexico-and-west-virginia-make-progress-provider-status>
 16. The New York Times Web Site. (2020). Retrieved September 15, 2020, from <https://www.nytimes.com/2020/04/22/us/santa-clara-county-coronavirus-death.html>
 17. Pharmaceutical Services Negotiating Committee Web Site. (2020). Retrieved September 15, 2020, from <https://psnc.org.uk/the-healthcare-landscape/covid19/wellbeing-and-testing/>
 18. Pharmaceutical Services Negotiating Committee Web Site. (2020). Retrieved September 15, 2020, from <https://psnc.org.uk/the-healthcare-landscape/covid19/>
 19. Pharmaceutical Services Negotiating Committee Web Site. (2020). Retrieved September 15, 2020, from <https://psnc.org.uk/our-news/update-on-covid-19-pandemic-medicines-delivery-service/>
 20. Pharmaceutical Services Negotiating Committee Web Site. (2020). Retrieved September 15, 2020, from <https://psnc.org.uk/our-news/keeping-your-pharmacy-or-pharmacies-open/>
 21. Pharmaceutical Services Negotiating Committee Web Site. (2020). Retrieved September 15, 2020, from <https://psnc.org.uk/our-news/covid-19-update-pandemic-posters-being-mailed-to-pharmacies/>
 22. Pharmaceutical Group of European Union Web Site. (2020). Retrieved September 17, 2020, from <https://www.pgeu.eu/publications/press-release-community-pharmacists-in-the-frontline-in-the-fight-against-the-novel-corona-virus-disease-covid-19/>
 23. Todd, A., Copeland, A., Husband, A., Kasim, A., Bambra, C. (2014). The positive pharmacy care law: An area-level analysis of the relationship between community pharmacy distribution, urbanity and social deprivation in England. *BMJ Open*, 4(8), e005764. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2014-005764>
 24. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Web Site. (2020). Retrieved October 1, 2020, from <https://covid19.saglik.gov.tr/>

25. Worldometer Web Site. (2020). Retrieved October 1, 2020, from <https://www.worldometers.info/coronavirus/>
26. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Web Site. (2020). Retrieved October 1, 2020, from <https://shgm.saglik.gov.tr/TR,55587/201910-saglik-hizmeti-sunucularinin-basamaklandirilmesi-hakkinda-genelge.html>
27. Yazıcıoğlu, Y., Erdoğan, S. (2014). SPSS Uygulamalı Bilimsel Araştırma Yöntemleri, Detay Yayıncılık, Ankara, 102-108.
28. Büyüköztürk, Ş., Çakmak, E.K., Akgün, Ö.E., Karadeniz, Ş., Demirel, F. (2017). Eğitimde Bilimsel Araştırma Yöntemleri, Pegem Akademi, Ankara, 138-145.
29. The Lancet (2020). COVID-19: Fighting panic with information. *Lancet (London, England)*, 395(10224), 537. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30379-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30379-2)
30. World Health Organization Web Site. (2020). Retrieved September 18, 2020, from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/66155>
31. Strikas, R.A., Wallace, G.S., Myers, M.G. (2002). Influenza pandemic preparedness action plan for the United States: 2002 update. *Clinical Infectious Diseases*, 35(5), 590-596. <https://doi.org/10.1086/342200>
32. Jennings, L.C., Lush, D. (2004). National pandemic planning must be an ongoing process. *International Congress Series*. Retrieved September 18, 2020, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S053151310400242>
33. Iwanowicz, S.L., Marciniak, M.W., Zeolla, M.M. (2006). Obtaining and providing health information in the community pharmacy setting. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 70(3), 1-16.
34. Pradhan, D., Biswasroy, P., Ghosh, G., Rath, G. (2020). A review of current interventions for COVID-19 prevention. *Archives of Medical Research*, 51(5), 363-374. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.04.020>
35. Zheng, S.Q., Yang, L., Zhou, P.X., Li, H.B., Liu, F., Zhao, R. (2021). Recommendations and guidance for providing pharmaceutical care services during COVID-19 pandemic: A China perspective. *Research in Social and Administrative Pharmacy*, 17(21), 1819-1824. <https://doi.org/10.1016/j.sapharm.2020.03.012>
36. The World Bank Web Site. (2020). Retrieved October 4, 2020, from <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/33611>
37. Cucinotta, D., Vanelli, M. (2020). WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta bio-medica: Atenei Parmensis*, 91(1), 157-160.
38. World Health Organization Web Site. (2020). Retrieved September 19, 2020, from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331561>
39. Business Insider Web Site. (2020). Retrieved September 23, 2020, from <https://www.businessinsider.com/italy-closing-all-stores-except-groceries-pharmacies-coronavirus-2020-3>

40. Fisher, C. (2020). Pharmacies urged to stay open seven days per week in the face of COVID-19. *The Pharmaceutical Journal*. Retrieved September 23, 2020, from <https://pharmaceutical-journal.com/article/news/pharmacies-urged-to-stay-open-seven-days-per-week-in-the-face-of-covid-19>
41. Ashiru-Oredope, D., Chan, A.H.Y., Olaoye, O., Rutter, V. (2020). Needs assessment and impact of COVID-19 on pharmacy professionals in 31 commonwealth countries. *Journal of Pharmaceutical Policy And Practice*, 13(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s40545-020-00275-7>



MOLECULAR BASIS AND INTEGRATIVE ANALYSIS OF Rv1463 AS PROBABLE CONSERVED ATP-BINDING PROTEIN BY COMPUTATIONAL APPROACH

*RV1463 OLASI KORUNMUŞ ATP BAĞLAYICI PROTEİNİN HESAPLAMALI YAKLAŞIMLA
MOLEKÜLER TEMEL BÜTÜNLEŞTİRİCİ ANALİZİ*

Md Amjad BEG¹ , Mustafa SEVİNDİK^{1,*} , Shahid Tanweer HAIDER¹ , Preeti SONI³ ,
Priya BHATIA⁴ , Shahzul HASAN⁵ , Richa YADAV⁶ , Fareeda ATHAR¹ 

¹Jamia Millia Islamia University, Centre for Interdisciplinary Research in Basic Science, 110025, New Delhi, India

²Osmaniye Korkut Ata University, Bahçe Vocational School, Department of Food Processing, 80500, Osmaniye, Turkey

³Shri Guru Ram Rai PG College, Department of Microbiology, 248001, Uttarakhand, India

⁴Apeejay Stya University, School of Bioscience, 122103, Haryana, India

⁵Jamia Millia Islamia University, Department of Biotechnology, 110025, New Delhi, India

⁶Kanya Gurukul Mahavidyalaya University, Department of Microbiology, 249404, Uttarakhand, India

ABSTRACT

Objective: Tuberculosis as a global epidemic since years due to vigorously changing dynamics of its causal pathogen, *Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv* (*M. tuberculosis*). This pathogen has worsened the situation therefore making it so challenging and hard to overcome. In this manuscript, we have used the computational approaches for ATP-binding protein of *Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv* (*M. tuberculosis*) that helps in transportation of metal ion across the plasma membranes and resultant generating an electrochemical gradient. Rv1463 a hypothetical protein possessing ATP binding motif (WalkerA) (GXXXXGKS/T), and (Walker B) (DEXXXXXD) and significance of these motifs in ATP binding and hydrolyzing activities. It shows the ATP-binding property by interacting with transcriptional regulatory protein and showing the interacted compounds as magnesium (Mg) and Adenosine di phosphate (ADP).

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Mustafa Sevindik
e-mail / e-posta: sevindik27@gmail.com

Material and Method: *The structure of Rv1463 has been build by the Swiss Model webserver and molecular docking was done using AutoDock.*

Result and Discussion: *In the mutational analysis which confirms that D175 residues was common in all interactions which may change the protein conformation. These computational approaches can be helpful in developing new strategies in treatment of this disease.*

Keywords: *Molecular docking, Mycobacterium tuberculosis, Rv1463, tuberculosis*

ÖZ

Amaç: *Tüberküloz, patojeni olan Mycobacterium tuberculosis H37Rv'nin (M. tuberculosis) şiddetle değişen dinamiği nedeniyle yıllardan beri küresel bir salgın olmuştur. Bu patojenin durumu daha da kötüleşmektedir ve üstesinden gelmek zorlaşmaktadır. Bu yazıda, metal iyonunun plazma membranları boyunca taşınmasına yardımcı olan ve sonuçta bir elektrokimyasal gradyan oluşturan Mycobacterium tuberculosis H37Rv'nin (M. tuberculosis) ATP bağlayıcı proteini için hesaplama yaklaşımlarını kullandı. Rv1463, ATP bağlama motifi (WalkerA) (GXXXXGKS / T) ve (WalkerA) (DEXXXXXD) içeren varsayımsal bir protein ve bu motiflerin ATP bağlama ve hidrolizleme aktivitelerindeki önemi üzerinde duruldu. ATP bağlanma özelliğini, transkripsiyonel düzenleyici protein ile etkileşime girerek ve etkileşimli bileşikler magnezyum (Mg) ve Adenosin di fosfat (ADP) ile gösterir.*

Gereç ve Yöntem: *Rv1463'ün yapısı SwissModel web sunucusu tarafından oluşturuldu ve AutoDock kullanılarak moleküler yerleştirme yapıldı.*

Sonuç ve Tartışma: *Mutasyonel analizde, D175 kalıntılarının protein yapısını değiştirebilecek tüm etkileşimlerde ortak olduğunu doğrulandı. Bu hesaplama yaklaşımları, bu hastalığın tedavisinde yeni stratejiler geliştirmede yardımcı olabilir.*

Anahtar Kelimeler: *Moleküler kenetlenme, Mycobacterium tuberculosis, rv1463, tüberküloz*

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) has become one of the major causes of death in many countries due to its highly infectious effect and is deadly in combination with the human immunodeficiency virus (HIV) [1]. *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (*M. tuberculosis*) is unique in its way as it do not contain a phospholipids external layer, secondly, it is acid-fast Gram-positive bacterium that do not take up the stains because of the high lipid and Mycolic acid content of its cell wall [2-4]. Though it is a pulmonary disease but sometimes it can also occur in other parts of the body like the brain, genital parts, eye, etc. Exceptionally, *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (*M. tuberculosis*), can persist inactively for a very long time in the alveolar macrophages by developing a permanent structure known as granuloma [5-7]. With great achievement in treating this disease, though the frequency of TB has been reduced to a good amount worldwide, but with the emergence of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) TB another extraordinary feature of this bacterium highlighted as it modified its molecular system [8,9]. Among many features of this bacterium that is responsible for its virulence, one of them is its ATP binding and hydrolyzing proteins which are responsible for various cellular mechanisms like cell signaling, cellular energetic, etc. One of the examples of ATP binding and hydrolyzing genes are ABC transporters family [10]. ABC transporter family is one of the huge and prominent superfamily of transporters gene that contributes widely in various physio-chemical processes taking place in a living cell [11]. The process of transportation conducted by ABC transporters is promoted by ATP. The process includes the binding of nuclear binding domains (NBDs) of ABC transporters with the Adenine

triphosphate (ATP) and followed by ATP hydrolysis for energy production required for this process to be carried out. NBD is the most conserved domain of the transporters, having all about 40-45% conserved sequences, irrespective of their substrate specificity and their origin [12,13]. Approximately all NBD-containing proteins are responsible for the transportation of substrate across the plasma membranes. In prokaryotes, the assembly of these domains is somewhat different as this is often found that separate subunits are assembled into a membrane-bound complex whereas in eukaryotes they are found to be fused into a single polypeptide chain [14].

The NBDs of ABC transporters performs various functions like ATP binding and hydrolysis, own highly conserved amino acid sequences, like the Walker_A (ATP/GTP binding site motif which can be described as [AG-x(4)-G-K-[ST], where X is any amino acid), the Walker_B (ATP/GTP binding site motif D-E-x(5)-D). Studies revealed that in other ATP binding proteins, Walker_A motif binds to ATP by the assistance of the oxygen molecules of the β - and γ -phosphates on the examined amino acids like lysine and glycine of the respective motif [15-17]. Membranous proteins like ATPases perform functions like the folding of proteins and degradation of proteins, replication initiation, DNA repair mechanism, and the transport of substances across the membrane using the energy released during ATP hydrolysis [18,19]. Some ATPases of *M. tuberculosis* like P-type ATPases are induced during infection only and play a key role in the survival of bacilli [20]. Highpoints of this manuscript include essential features of Rv1463 and provide important informations regarding the untouched sites of this bacterium that might provide a significant aspect of the molecular mechanisms involved in pathogenesis.

MATERIAL AND METHOD

Conserved hypothetical protein Rv1463 contain ATP binding motifs

M. tuberculosis genome has 4173 genes and database provides the most accurate annotation and is an appropriate tool to find out genomics and proteomics studies of this pathogenic mycobacteria. Mycobrowser database (<https://mycobrowser.epfl.ch/genes/>) is a large database server and a huge depository for the comprehensive genomic and proteomic study of mycobacteria species [21,22]. To study the sequence alignment between Rv1460 and Rv1463 was done by Clustal Omega, which is more truthful than earlier versions, it is allowing the large dataset to be aligned and having multiple processors which measured by a range of well-liked benchmarks [23,24]. To study the protein-protein interaction using STRING database (<https://string-db.org/>) contain a large amount of data including chemical properties and protein structures. These servers are implemented for the functionality aspect to differentiate between the proteins and chemicals not required for study purposes. The interpretation of the interaction result shown separately for each data and the cutoff value as low confidence: scores <0.4; medium: 0.4 to 0.7; high: >0.7 [25,26].

Protein subcellular localization

The localization of the Rv1463 studies gave beneficiary results for our analysis; we could easily do this by the TBpred and CELLO2GO server. TBpred (<http://crdd.osdd.net/raghava/tbpred/>) is an SVM-based server to predict the Mycobacterial protein localization. TBpred helps in predicting the protein localization in the cytoplasm, integral membrane, lipid-anchored, and secreted proteins [27]. Cello2Go webserver (<http://cello.life.nctu.edu.tw/cello2go/>) predicted the localization and the gene ontology annotation like molecular function, biological process, and cellular component [28,29].

Molecular modeling and Model validation

Molecular modeling demonstrates the presentation of atoms which facilitates through intensely précised (i.e. superior to test) numerical recreation, utilizing hypothetical information to determine the functions of protein [30]. Before the molecular modeling, we first predicted the two-dimensional structure of Rv1463 by using PSIPRED webserver [31]. The 3D model of the protein is essential for predicting the functions of protein and protein structure from its sequence is a challenging task for biologists but with the advancement, in technologies, we can easily predict the 3D structure of a protein by using an online webserver. Swiss Model is an online webserver that predicted the 3D model because of template-based modeling such as homology modeling which is one of the most consistent methods for producing the realistic 3D structure. With the help of modeling, we have discovered the drug, designing of ligand, sorting of the compounds on libraries, simulation studies of molecules their properties and behavior on an atomic level, etc. The cutoff estimation of the Swiss model as GMQE and QSQE means the quality estimation which combines properties from the target–template alignment and the template structure and qualitative model energy analysis which describing the major geometrical aspects of protein structures [32-34]. SAVES metaserver validated the predicted 3D modeled structure. Here the Ramachandran plot shows the overall geometry of the model which demonstrates the validated score and result which includes favored, allowed, and disallowed regions [35-37].

Molecular docking of Rv1463 with Phosphate, FDA approved TB drugs, and identify Natural inhibitors

Because of the drug resistance, it becomes so difficult to cure the disease pattern. The basic orientation between the receptor and the compound is provided by molecular docking analysis which was done by AutoDock Vina. For receptor preparation, the grid parameter was saved in CONF file. By using molecular docking, using pyrimidine nucleotide ADP, ATP, and FDA-approved TB drugs [38-40]. Discovery Studio BIOVIA (Discovery Studio Visualizer) has analyzed the 2D ligand-receptor interaction analysis of Rv1463 complexes which suggested the interacted residues in active sites and therefore further mutation analysis at these residues was done to confirm whether this mutation destabilizes protein or not [41].

Structural based mutation-induced stability deviations

At present, the prediction of the mutations can be done accurately with the help of various evolutionary tools [42]. In mutational analysis prediction by the physiochemical hypothesis can predict and can accurately measure the information which created the exact and versatile *in silico* way to deal with the mutation stability and changes that occur in the structure by the sequence-based predictions [43-44]. This study provides information regarding the protein stability results from a single point mutation. In this way, understanding has been created regarding the impacts of protein due to changes that occurred in the structure and connecting them with the size of the entire proteome.

RESULT AND DISCUSSION

Conserved hypothetical protein Rv1463 contain ATP binding motifs

In prokaryotes, the two ATP molecules are sandwiched between the Walker_A (ATP binding site motif A) (GX(4) GKS/T), and Walker_a (ATP binding site motif B) (DEXXXXXD) motifs of one monomer of ABC transporter [15,16]. After the sequence has retrieved from the Mycobrowser database showing Rv1463 has 801 bp gene length which means the protein length is 266 amino acids [20]. We have used the FASTA format amino acid sequence for sequence alignment by Clustal Omega to find out the similar region in between Rv1460 and Rv1463 and there is 51 percent good alignment else rest sequence shows average identity [23,24]. Here, in sequence alignment the ATP binding motifs A and B (GX(4)GKS/T and DEX(5)D) showing in the black outline (see Figure 1). Further analysis of Rv1463 protein-protein interaction was done by STRING database showing its interaction with Rv1461, Rv1462, *csd*, Rv1465, Rv1466, Rv1460, Rv3778c, Rv3284, Rv1459c and Rv2204c it listed here from increasing to decreasing order according to the predicted score (see Figure 1) [25,26]. The interacting functional partner Rv1463 is the ATP-binding protein ABC transporter and the highest interaction score with Rv1461 and Rv1462 is 0.999 is the outstanding outcome.

Protein subcellular localization

The predicted outcome of the subcellular localization was done by TBPred and CELLO2GO webserver and here it is predicted Rv1463 as a cytoplasmic protein which score is 2.8665111 cleared by amino acid composition based SVM method [27]. Using CELLO2GO prediction the protein topology and annotation of Rv1463 showing the localization in the cytoplasmic region with 96.7% else predicted the outcome of molecular function as ATPase activity with 27.2%, the biological process and cellular component (see Figure 2) [28].

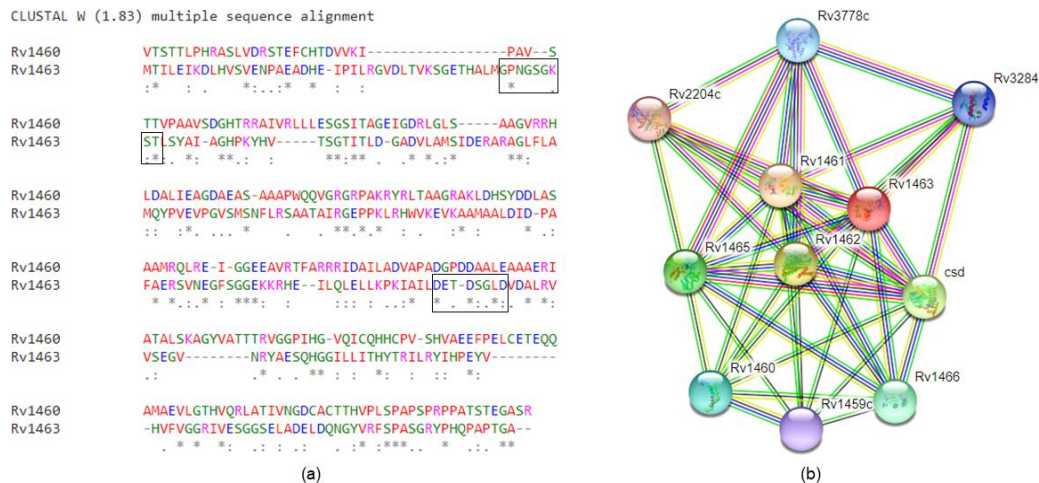


Figure 1. Conserved hypothetical protein Rv1463 contain ATP binding motifs: (a) Clustal Omega result outcome demonstrates multiple sequence alignment of Rv1463 and Rv1460 protein where the homology is shown 51% good alignment and a black box showing the ATP-binding motifs (A and B). (b) The protein-protein interaction of Rv1463 protein depicts here Rv1461 and Rv1462 is the highest scorer 0.999.

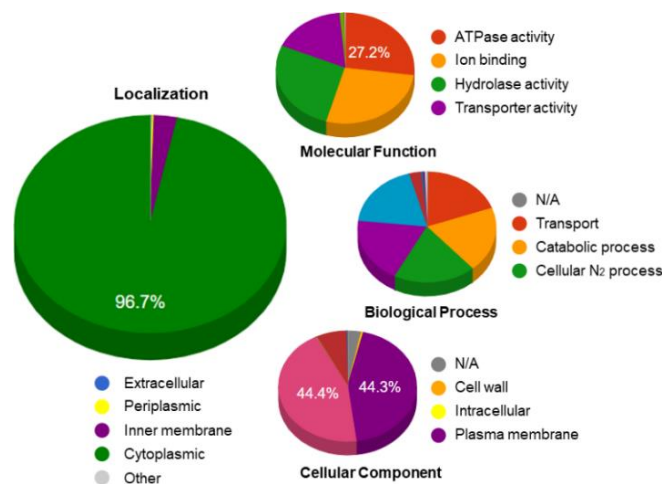


Figure 2. Protein subcellular localization: CELLO2GO webserver predictions are shown in these pie charts which showed the predicted localization and gene annotation.

Molecular modeling and Model validation

The secondary structure prediction was done by the PSIPRED webserver which shows this protein has 36.46% α -helix, 22.55% β -sheet, and 40.99% coiled region (see Figure 3) [31]. Finally, the three-dimensional structure prediction of the protein is used for the many essential biophysical and biochemical errands. For molecular modeling the FASTA format amino acid sequence retrieved from the Mycobrowser and using Swiss Model webserver, is based on the template-based homology

modeling. After acquiescing the amino acid sequence the best template comes out PDB ID: 2D2E which is SurfC protein (Crystal structure of atypical ABC-ATPase SurfC from *Thermus thermophilus* HB8) with 56.43% identity. The predicted model of Rv1463 is a monomer oligo state and no ligand bound with it the cutoff estimation of the GMQE is 0.70 and QMEAN is -0.30 with the satisfactory result where the 100% residues are modeled (see Figure 4) [34,35]. Modeled protein of Rv1463 validated by the Ramachandran plot analysis which is done by SAVES metaserver (PROCHECK). After analysis of the Ramachandran plot of our modeled protein, the structure of Rv1463 showed that 94.8% of residues have passed the criteria of most favored regions. Although, the other additional allowed residues of 4.7% and the disallowed region is 0.5%. The RAMPAGE server predicted the protein structure based on ϕ , ψ angle of individual residues (see Figure 5) [36-38].

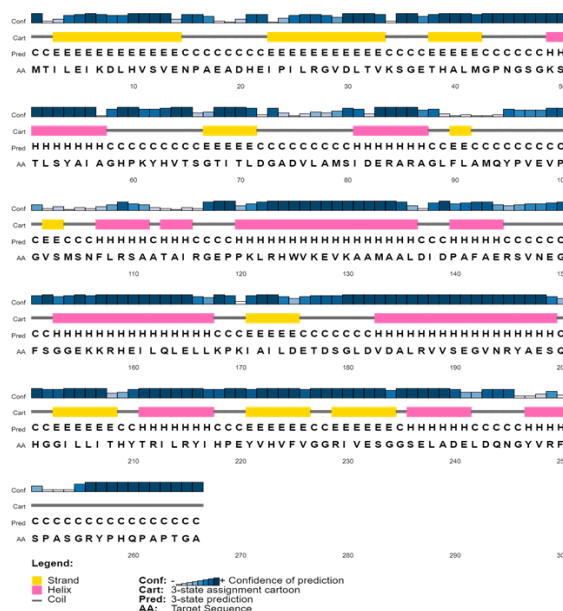


Figure 3. PSIPRED webserver predicted the secondary structure in this graphical output shows 11 α -helices extends and 10 β -strands which score 36.46% α -helix, 22.55% β -sheet and 40.99% coiled region.

Molecular docking of Rv1463 with Pyrimidine nucleotide and FDA approved TB drugs

The basic orientations between the receptor and the compound are provided by docking studies using AutoDock Vina. For the ligand-receptor preparation as the pdbqt form following the given steps [39]. After the ligand receptor preparation set the grid parameter in CONF file for the site-specific docking in the active site (see Figure 6). The set parameter of the CONF file is center X-7.148, Y-56.976, and Z-29.242 whereas the size X-24, Y-26, and Z-22. In the molecular docking studies with the pyrimidine nucleotide ADP and ATP, the docking score of the ADP is -8.5 kcal/mol and ATP is -6.7 kcal/mol.

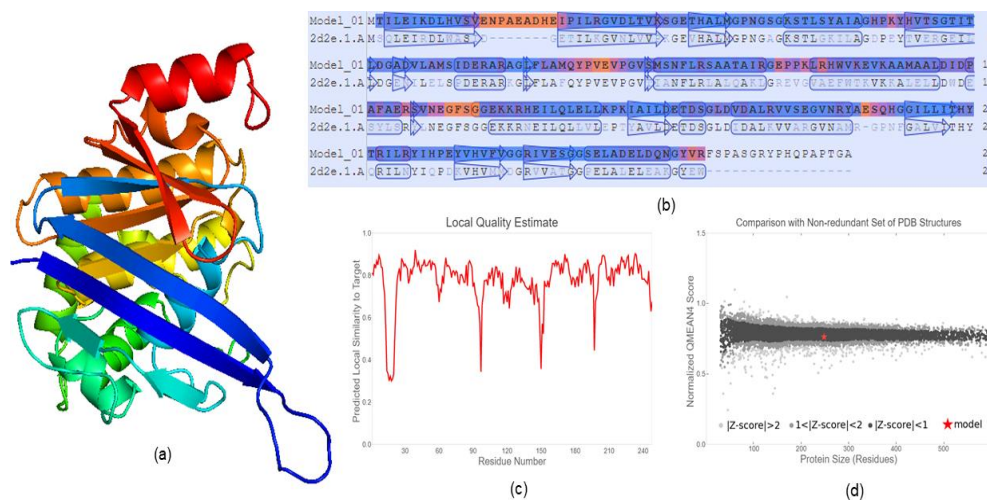


Figure 4. Protein modeling using Swiss Model webserver (a) Rv1463 predicted model cartoon represents (b) The PDB 2D2E template alignment. (c) Local quality estimate graph (d) Model lies in the non-redundant set of PDB structures.

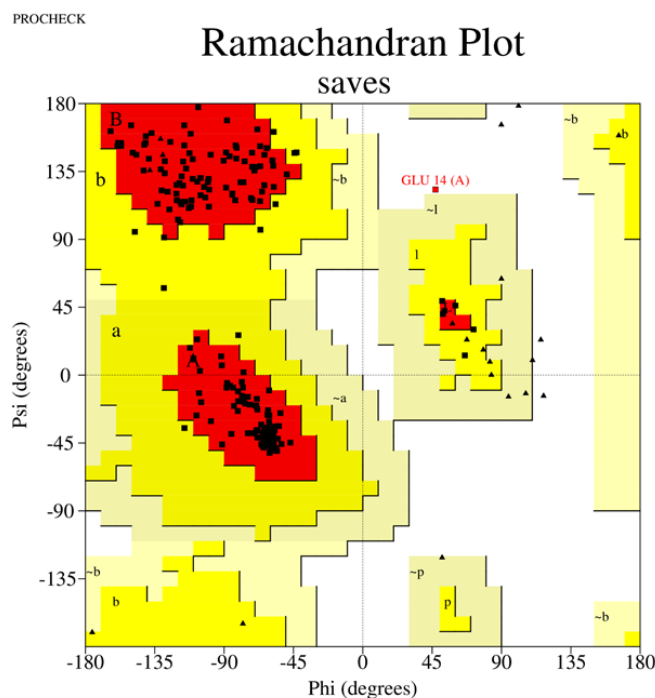


Figure 5. Model validation by using SAVES (PROCHECK) server here the Ramachandran plot shows 94.8% residues are in the most favored region.

Docking studies against the FDA-approved TB drugs the selected high binding affinity score targets are Clofazimine -8.4 kcal/ mol and Delamanid -8.3 kcal/mol. They both are used in the treatment of the drug-resistant TB. Clofazimine works by binding to the guanine bases, thereby blocking the DNA

template and inhibiting bacterial proliferation. Delamanid inhibits the synthesis of a component of the mycobacterial cell wall as mycolic acid and ketomycolic acid [40,41]. By using BIOVIA tool to analyze the two-dimensional interaction between ligand-receptor we found that the pyrimidine nucleotide and TB drugs have some similar interacted residues ILE173 and ASP175 else interacted residues within the active pocket (see Figure 7) [42].

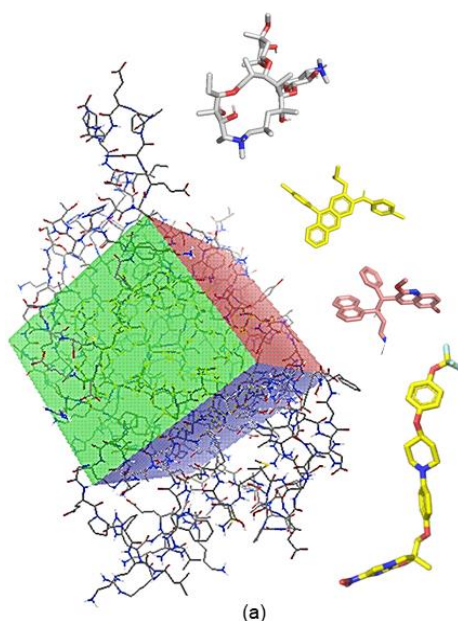


Figure 6. Preparation of the grid box related to Site specific docking here, possible bindings of all of the ligands within the active sites in the box.

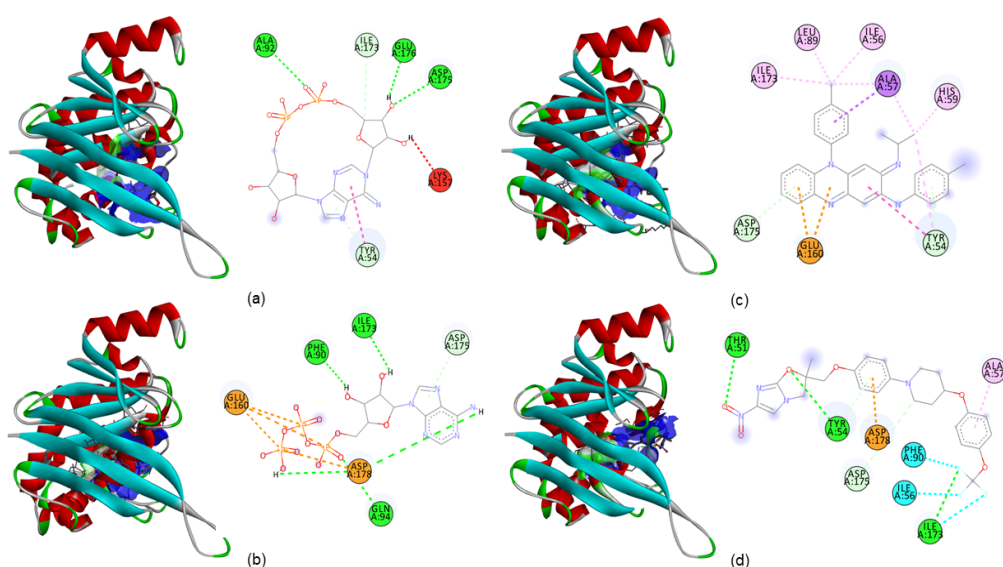


Figure 7. 2D interaction analysis of the pyrimidine nucleotide (a) ADP (b) ATP and TB drugs (c) Clofazimine and (d) Delamanid.

Structural based mutation-induced stability deviations

The mutation analysis at the respective residues i.e. ILE173 and ASP175 was done by DynaMut webserver which confirms whether this mutation destabilizes protein or not. In protein stability after the single point amino acid mutation with other Nucleophilic, Hydrophobic, Aromatic, Acidic, Amide and basic amino acid of Rv1463 which evaluate the mutational amino acid in (kcal/mol) value which defines that negative values of the mutated residues and decreases the protein stability [43,44]. The mutational analysis predicted the Rv1463 protein was maximally destabilizing on position ASP175 by changing Aspartate into Alanine (ASP175ALA) and Glycine (ASP175GLY). The predicted destablity value mostly destabilizing on positioned Aspartate into Alanine -0.583 kcal/mol and Aspartate into Glycine -0.379 kcal/mol. Here, Aspartate into Alanine (ASP175ALA) mutation predicted as the most destabilizing and it will destabilize the protein conformation (see Figure 8) [45-47]. As many studies already revealed the importance of ATP binding genes in various biological processes of living organisms, thus this work delivers importance of Rv1463 as different and interesting part for understanding the molecular mechanism of survival of this bacterium.

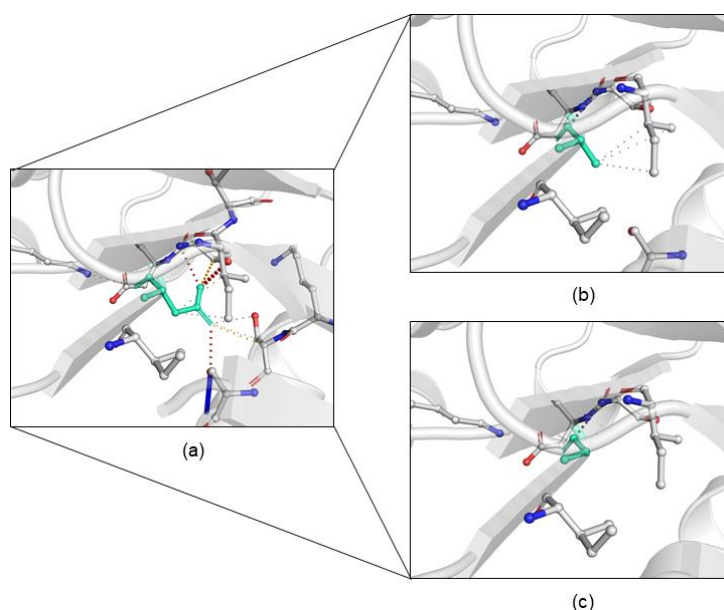


Figure 8. In mutation analysis on selected residues ASP175 for visualizing the drastic changes in interatomic interaction between (a) wildtype (b) mutant (ASP175ALA) and (c) mutant (ASP175GLY) which shows mutation showing the bond disruptions which predicted drastic changes in protein stability.

This worldwide threat mystified the new discoveries by developing resistance to each line drugs and increases the mortality rate worldwide. This situation demands for innovative way to deal with this bacillus and reduce this global problem. In our current study it emphasizes that these proteins can be

used as a potential target for developing anti -TB approaches. Rv1463 is conserved hypothetical protein whose function are still unknown and not studied earlier as well. Rv1463 contains both ATP binding motifs A and B (GX(4)GKS/T and DEX(5)D) and many other properties which resemble that it with an ATP binding and ABC transporter gene. This study provides essential characteristics of the potential ATP binding properties. Mutational analysis predicted the essentiality of ASP175 residue of the Rv1463 which mutated with Alanine has destabilize the protein conformational changes in the stability. As discussed earlier the importance of ATP molecule which helps in the survival and pathogenesis of *M. tuberculosis*, so disruption in these genes can disrupt the bacilli pathogenesis and its survival rate. These might be used as potential novel drug target.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author Md. Amjad Beg also acknowledges University Grants Commission Maulana Azad National Fellowship for the support and Jamia Millia Islamia University.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Simmons, J.D., Stein, C.M., Seshadri, C., Campo, M., Alter, G., Fortune, S., Schurr, E., Wallis, R.S., Churchyard, G., Mayanja-Kizza, H., Boom, W.H., Hawn, T.R. (2018). Immunological mechanisms of human resistance to persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Nature Reviews Immunology*, 18(9), 575 – 589.
2. Brennan, P.J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 83(1–3), 91 – 97.
3. Beg, M.A., Shivangi Thakur S.C., Meena, L.S. (2018). Structural Prediction and Mutational Analysis of Rv3906c Gene of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv to Determine Its Essentiality in Survival. *Advances in Bioinformatics*, 6152014.

4. Glaziou, P., Floyd, K., Raviglione, M.C. (2018). Global Epidemiology of Tuberculosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 39(3), 271 – 285.
5. Ndlovu, H., Marakalala, M.J. (2016). Granulomas and Inflammation: Host-Directed Therapies for Tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, 7, 434.
6. Silva Miranda, M., Breiman, A., Allain, S., Deknuydt, F., Altare, F. (2012). The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria? *Clinical and Developmental Immunology*, 139127.
7. Russell, D.G., Cardona, P.J., Kim, M.J., Allain, S., Altare, F. (2009). Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nature Immunology*, 10(9), 943 – 948.
8. Gandhi, N.R., Nunn, P., Dheda, K., Schaaf, H.S., Zignol, M., van Soolingen, D., Jensen, P., Bayona, J. (2010). Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *The Lancet*, 375(9728), 1830 – 1843.
9. Shivangi, Beg, A., Meena, S., Meena, L.S. (2017). To Find out the Essentiality of Rv0526 Gene in Virulence of *Mycobacterium Tuberculosis* by using *in silico* Approaches. *Open Journal of Bacteriology*, 1(1), 13 – 15.
10. Qiu, W., Liesa, M., Carpenter, E.P., Shirihai, O.S. (2015). ATP Binding and Hydrolysis Properties of ABCB10 and Their Regulation by Glutathione. *PLoS One*, 10(6), e0129772.
11. Braibant, M., Gilot, P., Content, J. (2000). The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 449 – 467.
12. Cassio Barreto de Oliveira, M., Balan, A. (2020). The ATP-Binding Cassette (ABC) Transport Systems in *Mycobacterium tuberculosis*: Structure, Function, and Possible Targets for Therapeutics. *Biology*, 9(12), E443.
13. Soni, D.K., Dubey, S.K., Bhatnagar, R. (2020). ATP-binding cassette (ABC) import systems of *Mycobacterium tuberculosis*: target for drug and vaccine development. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 207 – 220.
14. Balakrishnan, L., Venter, H., Shilling, R.A., van Veen, H.W. (2004). Reversible transport by the ATP-binding cassette multidrug export pump LmrA: ATP synthesis at the expense of downhill ethidium uptake. *Journal of Biological Chemistry*, 279(12), 11273 – 11280.
15. Ambudkar, S.V., Kim, I.W., Xia, D., Sauna, Z.E. (2006). The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding. *FEBS Letters*, 580(4), 1049 – 1055.
16. Orelle, C., Dalmas, O., Gros, P., Di Pietro, A., Jault, J.M. (2003). The conserved glutamate residue adjacent to the Walker-B motif is the catalytic base for ATP hydrolysis in the ATP-binding cassette transporter BmrA. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 47002 – 47008.
17. Chen, M., Abele, R., Tampé, R. (2004). Functional non-equivalence of ATP-binding cassette signature motifs in the transporter associated with antigen processing (TAP). *Journal of Biological Chemistry*, 279(44), 46073 – 46081.

18. Vinothkumar, K.R., Henderson, R. (2010). Structures of membrane proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 43(1), 65 – 158.
19. Marinko, J.T., Huang, H., Penn, W.D., Capra, J.A., Schleich, J.P., Sanders, C.R. (2019). Folding and Misfolding of Human Membrane Proteins in Health and Disease: From Single Molecules to Cellular Proteostasis. *Chemical Reviews*, 119(9), 5537 – 5606.
20. Hung, L.W., Wang, I.X., Nikaido, K., Liu, P.Q., Ames, G.F., Kim, S.H. (1998). Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature*, 396(6712), 703 – 707.
21. Kapopoulou, A., Lew, J.M., Cole, S.T. (2011). The MycoBrowser portal: a comprehensive and manually annotated resource for mycobacterial genomes. *Tuberculosis*, 91(1), 8 – 13.
22. Shivangi, Beg, M.A., Meena, L.S. (2018). Insights of Rv2921c (Ftsy) Gene of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv To Prove Its Significance by Computational Approach. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 12(2), 9147 – 9157.
23. Beg, M.A., Shivangi, Thakur, S.C., Meena, L.S. (2019). Systematical analysis to assist the significance of Rv1907c gene with the pathogenic potentials of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Journal of Biotechnology and Biomaterials*, 8(4), 286.
24. Sievers, F., Higgins, D.G. (2014). Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods in Molecular Biology*, 1079, 105 – 116.
25. Von Mering, C., Huynen, M., Jaeggi, D., Schmidt, S., Bork, P., Snel, B. (2003). STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Research*, 31(1), 258 – 261.
26. Beg, M.A., Athar, F., Meena, L.S. (2019). Significant Aspect of Rv0378 Gene of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Reveals the PE_PGRS like Properties by Computational Approaches. *Journal of Biotechnology and Biomedicine*, 2(1), 24 – 39.
27. Rashid, M., Saha, S., Raghava, G.P. (2007). Support Vector Machine-based method for predicting subcellular localization of mycobacterial proteins using evolutionary information and motifs. *BMC Bioinformatics*, 8, 337.
28. Yu, C.S., Cheng, C.W., Su, W.C., Chang, K.C., Huang, S.W., Hwang, J.K., Lu, C.H. (2014). CELLO2GO: a web server for protein subCELLular LOCALization prediction with functional gene ontology annotation. *PLoS One*, 9(6), e99368.
29. Beg, M.A., Shivangi, Athar, F., Meena, L.S. (2018). Structural and Functional Annotation of Rv1514c Gene of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv As Glycosyl Transferases. *Journal of Advanced Research in Biotechnology*, 3(2), 1 – 9.
30. Bowie, J.U., Lüthy, R., Eisenberg, D. (1991). A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science*, 253(5016), 164 – 170.
31. Buchan, D.W.A., Jones, D.T. (2019). The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), 402 – 407.
32. Beg, M.A., Thakur, S.C., Athar, F. (2020). Computational annotations of mycobacterial Rv3632 that confers its efficient function in cell wall biogenesis. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, 8(2), 46 – 53.





33. Ma, J., Wang, S., Zhao, F., Xu, J. (2013). Protein threading using context-specific alignment potential. *Bioinformatics*, 29(13), 257 – 265.
34. Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Gallo Cassarino, T., Bertoni, M., Bordoli, L., Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, 42(Web Server issue), 252 – 258.
35. Beg, M.A., Thakur, S.C., Athar, F. (2020). Molecular modeling and *in silico* characterization of mycobacterial Rv3101c and Rv3102c proteins: prerequisite molecular target in cell division. *Pharmacy & Pharmacology International Journal*, 8(4), 234 – 243.
36. Ho, B.K., Brasseur, R. (2005). The Ramachandran plots of glycine and pre-proline. *BMC Structural Biology*, 5,14.
37. Cristobal, S., Zemla, A., Fischer, D., Rychlewski, L., Elofsson, A. (2001). A study of quality measures for protein threading models. *BMC Bioinformatics*, 2,5.
38. Wallner, B., Elofsson, A. (2003). Can correct protein models be identified? *Protein Science*, 12(5), 1073 – 1086.
39. Beg, M.A., Athar, F. (2020). Anti-HIV and Anti-HCV drugs are the putative inhibitors of RNA-dependent-RNA polymerase activity of NSP12 of the SARS CoV- 2 (COVID-19). *Pharmacy & Pharmacology International Journal*, 8(3), 163 – 172.
40. Trott, O., Olson, A.J. (2010). Auto Dock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455 – 461.
41. Beg, M.A., Athar, F. (2020). Pharmacokinetic and molecular docking studies of *Achyranthes aspera* phytochemicals to exploring potential anti-tuberculosis activity. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, 8(1), 18 – 27.
42. Biovia, D.S. (2015). Discovery studio modelling environment. San Diego. Dassault Systems.
43. Beg, M.A., Athar, F. (2020). Computational method in COVID-19: Revelation of Preliminary mutations of RdRp of SARS CoV-2 that build new horizons for therapeutic development. *Journal of Human Virology & Retrovirology*, 8(3), 62 – 72.
44. Rodrigues, C.H., Pires, D.E., Ascher, D.B. (2018). DynaMut: predicting the impact of mutations on protein conformation, flexibility and stability. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), 350 – W355.
45. Shivangi, Beg, M.A., Meena, L.S. (2019). Mutational effects on structural stability of SRP pathway dependent cotranslational protein ftsY of *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv. *Gene Reports*, 15, 100395.
46. Beg, M. A., Hejazi, I. I., Thakur, S. C., & Athar, F. (2021). Domain-wise differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇ Rv hypothetical proteins: A roadmap to discover bacterial survival potentials. *Biotechnology and applied biochemistry*, 10.1002/bab.2109.
47. Hejazi, I. I., Beg, M. A., Imam, M. A., Athar, F., & Islam, A. (2021). Glossary of phytoconstituents: Can these be repurposed against SARS CoV-2? A quick *in silico* screening of various phytoconstituents from plant *Glycyrrhiza glabra* with SARS CoV-2 main protease. *Food and*

chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 150, 112057. Advance online publication.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112057>



BAZI 4,5-DİHİDRO-1H-PİRAZOL VE ŞALKON TÜREVLERİNİN ANTİMİKROBİYAL VE ANTİTÜBERKÜLER ETKİLERİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

*INVESTIGATIONS ON ANTIMICROBIAL AND ANTITUBERCULAR ACTIVITY OF SOME
4,5-DIHYDRO-1H-PYRAZOLE AND CHALCONE DERIVATIVES*

Begum EVRANOS AKSÖZ^{1*} , Fatma KAYNAK ONURDAĞ² , Erkan AKSÖZ³ ,
Selda ÖZGEN ÖZGACAR⁴ 

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 32000, Isparta,
Türkiye

²Trakya Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 22030 Edirne,
Türkiye

³Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, 32000, Isparta,
Türkiye

⁴Sağlık Bakanlığı, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, 06520 Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada öncelikle şalkonlar ve bu şalkon türevlerinin hidrazitler ile reaksiyonu sonucu halka kapanması ile oluşan 4,5-dihidro-1H-pirazol yapısındaki bileşikler sentez edilmiş ve sentezlenen tüm bileşiklerin antimikrobiyal ve antitüberküler etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Benzaldehit ve asetofenon türevlerinin alkali ortamda metanol içindeki reaksiyonuyla elde edilen şalkonların, hidrazit türevleri ile etanol içindeki reaksiyonu sonucu 4,5-dihidro-1H-pirazol türevleri elde edilmiştir. Sentezlenen bu bileşiklerin antimikrobiyal etkileri mikrodilüsyon yöntemiyle, antitüberküler etkileri ise mikropilaka alamar mavisi deneyi ile saptanmıştır.

Sonuç ve Tartışma: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* izolat (gentamisine dirençli) ve *Candida albicans*'a karşı 4,5-dihidro-1H-pirazol yapısındaki bileşiklerin şalkonlardan daha etkili olduğu bulunmuştur. *Staphylococcus aureus*'a karşı ise şalkonlar 4,5-dihidro-1H-pirazol türevlerinden daha etkili bulunmuştur. *Staphylococcus aureus* izolat (MRSA)

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

ve *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı hem şalkonlar hem de 4,5-dihidro-1H-pirazol türevleri aynı etkiyi göstermiştir. B21 bileşiği *Candida krusei* üzerinde flukonazole aynı etkiyi göstermiştir. B20 bileşiği ise *Candida krusei* üzerine flukonazolden daha etkili bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal etki, antitüberküler etki, 4,5-dihidro-1H-pirazol, şalkon

ABSTRACT

Objective: In this study, first of all, chalcones and the compounds in the structure of 4,5-dihydro-1H-pyrazole, which are formed by ring closure as a result of the reaction of the chalcones with hydrazides were synthesized and the antimicrobial and antitubercular effects of all synthesized compounds were investigated.

Material and Method: 4,5-Dihydro-1H-pyrazole derivatives were obtained as a result of the reaction of chalcones acquired by the reaction of benzaldehyde and acetophenone derivatives in methanol in alkaline medium, with hydrazide derivatives in methanol. The antimicrobial effects of these synthesized compounds were determined by microdilution method and their antitubercular effects were determined by microplate alamar blue assay.

Result and Discussion: Compounds in the structure of 4,5-dihydro-1H-pyrazole were found to be more effective than chalcones against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* isolate (gentamicin resistant) and *Candida albicans*. Against the strain of *Staphylococcus aureus*, chalcones were found to be more effective than 4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives. Both chalcones and 4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives showed similar effect against *Staphylococcus aureus* isolate (MRSA) and *Mycobacterium tuberculosis*. Compound B21 had the same activity with fluconazole against *Candida krusei*. Compound B20 was found to be more effective than fluconazole against *Candida krusei*.

Keywords: Antimicrobial activity, antitubercular activity, chalcone, 4,5-dihydro-1H-pyrazole

GİRİŞ

Kandidalar insanın normal mikroflorasında bulunan, bununla birlikte bağışıklık sisteminin zayıflaması ile insan için tehdit oluşturmaya başlayan fırsatçı funguslardır. Bu funguslar, gastrointestinal sistem, vajina ve ağız mukozasının normal florasında mevcut olup, vücudun bu kısımlarında akut veya kronik enfeksiyona yol açabilmektedirler [1,2]. 350'nin üzerinde kandida türü olmasına rağmen bu kandida türlerinden *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Candida guilliermondii* ve *Candida kefyr* insanlarda hastalığa neden olabilir [1,3].

C. krusei, *C. albicans* ile karşılaştırıldığında epitelyal ve prostetik yüzeylere yapışma özelliği, fosfolipaz üretimi ve proteolitik enzim potansiyeli daha düşük olduğu için daha az virulan bir kandida türüdür. Fakat *C. krusei*'nin patojenitesi gün geçtikçe artmaktadır. *C. krusei* bağışıklığı zayıflamış kişilerde fungemi, endoftalmi, artrit, endokardit gibi hastalıklara neden olabilmektedir [4].

Candida albicans, insan mikrobiotasında en sık rastlanılan fungus türüdür. Konakçının bağışıklığında meydana gelen değişiklikler, stres gibi faktörlerin etkisi ile bazen *Candida albicans* kolonisi aşırı büyüyerek yüzeysel mukozal enfeksiyonlardan, hematogen olarak yayılmış kandidiazise kadar pek çok hastalığa neden olabilmektedir [5].

Memelilerin bağırsak florasında yaşayan *Escherichia coli*, bağışıklığın zayıflaması ile birlikte enterit, üriner sistem enfeksiyonu, septisemi, neonatal menenjit gibi hastalıklara yol açabilmektedir [6]. *Pseudomonas aeruginosa*, pnömoni, menenjit ve hastane enfeksiyonları gibi pek çok hastalığa neden olan,

yüksek morbidite ve mortalite oluşturan, pek çok antibiyotiğe karşı direnç geliştirdiği için tedavisi zor olan bir bakteridir [7]. *Staphylococcus aureus*, bakteriyemi, yumuşak doku enfeksiyonları, hastane enfeksiyonları, osteomyelit gibi hastalıklara neden olabilmektedir. *S. aureus* başlangıçta metisilin ile tedavi edilebilirken sonrasında metisiline dirençli suşlar (MRSA), daha sonraları ise çoklu antibiyotik direnci geliştirdiğinden tedavisi oldukça güçtür [8]. *Enterococcus faecalis*, insan florasında doğal olarak bulunan, hastane enfeksiyonlarına neden olabilen ve pek çok antibiyotiğe karşı direnç geliştirmiş bir bakteridir [9]. *Mycobacterium tuberculosis*, verem hastalığına neden olmaktadır. Yavaş çoğalan, organizmada çoğalmadan uzun süre canlı kalabilen bu bakteri, konakçının bağışıklığı zayıfladığında aktif hale gelmektedir [10].

Pirazol halkası, bünyesinde birbirine komşu iki tane azot atomu taşıyan doymamış bir halkadır. Pirazol halkasındaki çifte bağlardan bir tanesinin doyurulması ile elde edilen 4,5-dihidro-1H-pirazol halkası gösterdiği çok çeşitli biyolojik etkileri nedeniyle araştırmacıların ilgisini çekmektedir [11,12]. Bu halka sisteminin sahip olduğu biyolojik etkilerden bazıları antimikrobiyal, antitüberküler, antiinflamatuvar [13,14], antioksidan [14], antidepresan [15] etkidir.

Şalkonlar flavonoid ailesinin önemli bir üyesidir [16]. 1,3-Diaril-2-propen-1-on yapısındaki şalkonlar, doğada sebzeler, meyveler ve diğer pek çok bitkide bulunan renkli bileşiklerdir. Cis ve trans izomerleri mevcut olan bu bileşiklerin, trans izomerleri daha dayanıklı ve kararlı olduğundan, çoğunlukla trans izomer halinde buldukları görülmektedir [17, 18]. Doğada yaygın olarak bulunan bu bileşikler gösterdikleri farmakolojik etkileri ile dikkat çekmektedir. Şalkonlar antiinflamatuvar, antioksidan, antikanser, antiviral [19], antitüberküler [19, 20], antifungal [19, 21-24], antibakteriyel [25, 26], antimalaryal [27] gibi farmakolojik etkiler göstermektedirler. Biz de bu amaçla sentezlediğimiz 4,5-dihidro-1H-pirazol ve şalkon türevi bileşiklerin antifungal, antibakteriyel ve antitüberküler etkilerini araştırdık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Sentez

Şalkon türevleri potasyum hidroksit varlığında metanol içinde asetofenon ve benzaldehit türevlerinin reaksiyona girmesi ile elde edilmiştir. Elde edilen şalkon türevlerinin hidrazit bileşikleri ile reaksiyona girmesi sonucu 2-pirazolin türevi bileşikler sentez edilmiştir. Sentezlenmiş bileşiklerin sentez detayları, fizikokimyasal ve spektral özellikleri daha önce yayınlanmıştır [28].

Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite Tayini

Bu çalışmada *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Candida krusei* ATCC 6258 standart suşları kullanıldı. Klinik izolatlar olarak da *E. coli* izolatı (ESBL: Genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz, tüm beta laktam antibiyotiklerine

dirençli), *P. aeruginosa* izolatu (gentamisine dirençli), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* izolatu [MRSA (metisiline dirençli), tüm betalaktam antibiyotiklere dirençli], *E. faecalis* izolatu [VRE (vankomisine dirençli)] kullanılmıştır. Bakteriyel ve fungal duyarlılık testleri sırası ile Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S16 [29] ve M27-A3 [30] önerilerine göre uygulanmıştır.

Bu çalışmadaki kültür ve mikrodilüsyon testleri için Mueller Hinton Agar (MHA) (Merck), Mueller Hinton Broth (MHB) (Merck), Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) (Merck), Sabouraud Liquid Medium (SLM) (Merck) ve MOPS (Sigma) ile pH'ı 7'ye ayarlanmış L-glutaminli RPMI-1640 besiyeri (Sigma) kullanılmıştır.

Ampisilin (Mustafa Nevzat İlaç Sanayii), gentamisin (Paninkret Chem.-Pharm.), ofloksasin (Zhejiang Huangyan East Asia Chemical CO. Ltd.), meropenem (Astra Zeneca), vankomisin (Mayne Pharma), ampisilin/sulbaktam (1:1) (Mustafa Nevzat İlaç San.), amoksisilin/klavulanik asit (2:1) (Deva İlaç), flukonazol (Pfizer) ve amfoterisin B (Bristol Myers Squibb) nin standard tozları üreticilerinden temin edilmiştir. Test edilen bileşiklerin stok çözeltileri DMSO'da çözülmüştür. Standart antibiyotik çözeltileri CLSI standartlarında tavsiye edilen uygun çözücülerde çözülmüştür [29, 30].

Test edilen bileşiklerin stok çözeltileri ve standart olarak kullanılan ilaçlar mikrop lakanın kuyucuklarında çift katlı olarak seyreltilmiştir. Sentezlenmiş bileşikler 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 µg/mL konsantrasyonlarında, standart ilaçlar ise 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03, 0.015, 0.008, 0.004, 0.002, 0.001 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

Antibakteriyel duyarlılık testi için mikrop lakanın her bir kuyucuğuna 100 µl Mueller Hinton Broth (MHB) eklenmiştir. İnokülasyon için kullanılan bakteriyel süspansiyonlar McFarland 0.5 yoğunluğunda taze kültürler seyreltilerek 105 CFU/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. Her bir mikrop lak kuyucuğuna bu bakteri inokulumundan 10µl eklenmiştir. Mikrop laklar 37°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, makroskopik olarak üremeyi inhibe eden en düşük madde konsantrasyonları minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak saptanmıştır.

Fungal duyarlılık testi için, mikrop lakların her kuyucuğuna, MOPS ile pH 7'ye tamponlanmış L-glutaminli RPMI-1640 besiyeri ilave edilmiştir. İnokülasyon için kullanılan maya süspansiyonları, McFarland 0.5 yoğunluğundan önce 1:100, sonra 1:20 oranında seyreltilerek 2.5x10³ CFU/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. Mikrop lakların her bir kuyucuğuna bu inokulumdan 10 µl eklenmiştir. Mikrop laklar 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, makroskopik üremeyi inhibe eden en düşük madde konsantrasyonları minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak saptanmıştır.

Antitüberküler Aktivite Tayini

Mycobacterium tuberculosis H37RV ATCC 27294 suşu Middlebrook 7H11 agar (Becton Dickinson) içinde çoğaltıldı. Kültür süspansiyonları %0.04 (h/h) Tween 80-%0.2 sığır serum albümininde (Sigma), Mac Farland 1 yoğunluğunda hazırlandı. Süspansiyonlar sonra 7H9GC buyyon içinde 4.7 g

Middlebrook 7H9 buyyon (Difco), 20 ml %10'luk (h/h) gliserol, 1 g Bacto Casitone (Difco), 880 ml distile su, 100 ml oleik asit, albümin, dekstroz ve katalaz (Sigma) ile 1:25 oranında seyreltildi.

Bileşikler sonuç konsantrasyonları 4096 µg ml⁻¹ olacak şekilde dimetilsülfoksit (DMSO; Merck) içinde çözüldü ve 0.22 µm por çapına sahip filtreler (Millipore) ile süzülerek sterilize edildi ve stok çözelti olarak kullanıldı. Stok çözeltiler sıvı besiyeri ile seyreltildi. İzoniazit (INH) ve etambutol (EMB) Sigma'dan temin edildi. INH ve EMB'nin stok çözeltileri deiyonize suda hazırlandı. Bileşiklerin ve standartların çözeltileri hazırlandı ve mikropılaka kuyucuklarında sıvı besiyeri ile 4096, 2048, 1024, 512,...0,0625 µg ml⁻¹ konsantrasyonlara seyreltildi.

İnkübasyon sırasında ortamın buharlaşmasını en aza indirmek için dış çevre kuyucuklarına iki yüz mikrolitre steril deiyonize su ilave edildi. 3 ile 11 arasındaki sütunlarda B'den G'ye kadar olan sıradaki kuyucuklara 100 µl 7H9GC buyyon ilave edildi. 2. ve 3. Sütunlardaki B'den G'ye kadar olan sıradaki kuyucuklara çok kanallı bir pipet kullanılarak 100 µl stok çözelti eklendi. 100 µl 3. sütundan 4. sütuna aktarıldı ve kuyucukların içeriği karıştırıldı. Sütun 10 ile çift katlı seri seyreltmeler yapıldı.

2 ile 11 arasındaki sütunlarda B'den G'ye kadar sıradaki kuyucuklara çok kanallı bir pipet kullanılarak 100 µl *M. tuberculosis* inokulumu eklendi. 11. sütundaki kuyucuklar büyüme kontrolü olarak kullanıldı. Plakalar parafilm ile kapatıldı ve 5 gün 37 °C' de inkübe edildi. 50 µl taze hazırlanmış 1:1 oranında 10X Alamar Blue (AbD Serotec) indikatörü ve %10'luk Tween 80 B11 kuyucuğuna ilave edildi. Plakalar 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edildi. B11 pembeye döndüğünde mikropılakadaki tüm kuyucuklara boya karışımı eklendi. Mikropılaklar yeniden parafilm ile kapatıldı ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi ve tüm kuyucukların renkleri kaydedildi. Kuyucuktaki mavi renk üreme olmadığını, pembe renk ise üreme olduğunu göstermektedir. MİK değeri maviden pembeye renk dönüşümünü önleyen en düşük ilaç konsantrasyonu olarak tanımlanmıştır [31].

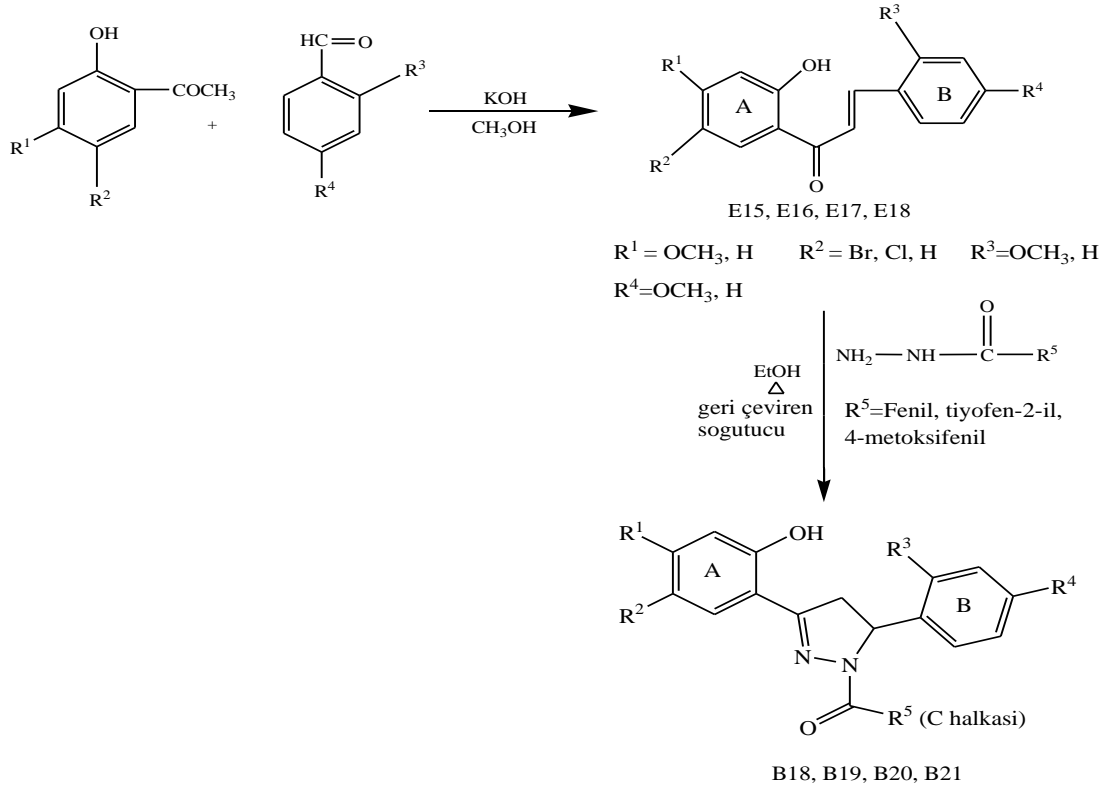
Her bir deneydeki tüm testler 3 kez tekrar edildi. İnokulum hazırlanmadan önce saflığı ve canlılığı sağlamak için, mikroorganizmalar en az iki kez pasajlandı. Kalite kontrol suşları (ATCC) deneyin doğruluğunu göstermek amacıyla kullanıldı ve bütün sonuçlar CLSI standartlarında belirtilen MİK değerlerinde bulundu. Sterilite kontrolü olarak inoküle edilmemiş besiyeri kullanılmıştır. İnoküle edilen ilaçsız besiyeri ise üreme kontrolü olarak kullanılmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Öncelikle şalkon yapısındaki **E15**, **E16**, **E17** ve **E18** bileşikleri, asetofenon ve benzaldehit türevlerinin reaksiyonu ile elde edilmiştir. Bu şalkonlardan **E15**'in 2-tiyofen karboksilik asit hidrazit ile reaksiyonu ile **B21**, **E16**'nın 4-metoksi benzoik hidrazit ile reaksiyonu ile **B20**, **E17**'nin 4-metoksi benzoik hidrazit ile reaksiyonu ile **B19** ve **E18**'in benzoik hidrazit ile reaksiyonu sonucu **B18** elde edilmiştir (Şekil 1). Sentez edilen bileşiklerin formülleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Sentezi gerçekleştirilen bu bileşiklerin *E. coli*'nin, *P. aeruginosa*'nın, *S. aureus*'un, *E. faecalis*'in farklı suşları üzerinde antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Antifungal etkileri, *C. albicans* ve *C. krusei* suşları üzerinde, antitüberküler etkileri ise *M. tuberculosis* kullanılarak test edilmiştir. Elde edilen MİK değerleri ($\mu\text{g/mL}$) Tablo 2'de gösterilmiştir.

Şalkon yapısının pirazolin yapısına dönüşümü ile *E. coli* ATCC 25922 suşu, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* izolat (gentamisine dirençli) ve *C. albicans*'a karşı etkinin arttığını görmekteyiz. Hem şalkon hem de pirazolinler *E. coli* ATCC 35218 suşu, *E. coli* izolat (ESBL) ve *S. aureus* izolat (MRSA) üzerinde aynı etkiyi göstermiştir. Bu da bu bakteriler üzerine etki söz konusu olduğunda açık zincir yapısı veya kapalı halka yapısı arasında bir fark olmadığını göstermektedir. Oysa *S. aureus* üzerine şalkon bileşiklerinin pirazolinlere göre daha etkili olduğunu görmekteyiz. Bu da açık zincir yapısının *S. aureus* açısından önemli olduğunu ifade eder.



Şekil 1. Bileşiklerin sentezi. Asetofenon ve benzaldehit türevlerinin oda sıcaklığında metanol içinde KOH varlığında reaksiyonu ile şalkonlar, şalkonlarında hidrazit türevleri ile etanol içinde ısıtılmasıyla 4,5-dihidro-1H-pirazol türevleri elde edilmiştir.

Tablo 1. Sentez edilen bileşiklerin formülleri

Bileşik	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
B18	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-Fenil
B19	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	4-Metoksi fenil
B20	-H	-Br	-H	-OCH ₃	4-Metoksi fenil
B21	-H	-Cl	-H	-OCH ₃	Tiyofen-2-il
E15	-H	-Cl	-H	-OCH ₃	-
E16	-H	-Br	-H	-OCH ₃	-
E17	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-
E18	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-

Tablo 2. Bileşiklerin antimikrobiyal ve antitüberküler etkileri

Bileşikler	MİK değerleri (µg/mL)											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
B18	64	128	128	64	64	256	64	128	128	64	64	64
B19	64	128	128	64	64	256	64	64	128	32	64	64
B20	64	128	128	64	64	128	64	64	64	32	16	64
B21	64	128	128	64	64	128	64	64	64	32	32	64
E15	128	128	128	128	128	64	64	128	128	128	64	64
E16	128	128	128	128	128	64	64	128	128	128	64	64
E17	128	128	128	128	128	64	64	128	128	128	64	64
E18	128	128	128	128	128	64	64	128	128	128	64	64
Ampisilin	2	-	>1024	-	-	0.5	-	0.5	0.5	-	-	-
Gentamisin	0.25	-	256	1	64	0.5	128	8	8	-	-	-
Ofloksasin	0.015	-	16	1	1	0.125	0.5	1	4	-	-	-
Meropenem	0.008	-	0.015	0.25	0.015	0.03	-	4	8	-	-	-
Vankomisin	-	-	-	-	-	0.5	1	1	8	-	-	-
Ampisilin/ sulbaktam (1/1)	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amoksisilin/klavulonik asit (2/1)	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flukonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0625	32	-
Amfoterisin B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0.03	0.5	-
Etambutol												4
İzoniazit												0.125

A: *E.coli* ATCC 25922, B: *E.coli* ATCC 35218, C: *E.coli* izolat (ESBL), D: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, E: *P.aeruginosa* izolat (gentamisine dirençli), F: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, G: *S.aureus* izolat (MRSA), H: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, I: *E.faecalis* izolat (VRE), J: *Candida albicans* ATCC 10231, K: *C.krusei* ATCC 6258, L: *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294.

B19, **B20**, **B21** bileşikleri *C. albicans*'a karşı 32 µg/mL MİK değeri ile aynı etkiyi göstermiştir. **B19** ve **B20** bileşiklerinin B ve C halkasında bulundurduğu fonksiyonlu gruplar tamamen aynıdır. Bu iki bileşiğin taşıdığı A halkası birbirinden farklıdır. Bu da *C. albicans* karşısındaki etki için B ve C halkasının belirleyici olduğunu göstermektedir. A halkası *C. albicans* karşısındaki etkide çok önemli olmadığından, **B20** ve **B21** bileşiklerinin B halkası aynı olduğundan C halkasının tiyofen veya 4-metoksi benzen olmasının çok fark oluşturmadığı görülmektedir.

S. aureus üzerine pirazolin yapısının A halkasında metoksil grubu yerine klor, brom gibi bir halojen atomunun varlığının aktiviteyi olumlu etkilediği söylenebilir.

B18 ve **B19** bileşikler karşılaştırıldığında iki bileşiğin de A halkasında 2. konumda hidroksil, 4. konumda ise metoksil grubu bulunmaktadır. **B18** bileşiği B halkasının 2. konumunda bir metoksil grubu taşırken, **B19** bileşiği B halkasının 4. konumunda bir metoksil grubu taşımaktadır. **B18** bileşiği C halkasında benzen halkası taşırken, **B19** bileşiği C halkasında 4-metoksi benzen taşımaktadır. *E. faecalis* ve *C. albicans* üzerine; **B19**, **B18**'e göre daha etkili olduğundan B halkasındaki metoksil grubunun benzen halkasının 4. konumunda olması ve C halkasında benzen yerine metoksi benzen varlığı etkide artışa neden olmaktadır.

M. tuberculosis üzerine şalkon ve pirazolin yapısındaki tüm bileşikler 64 µg/mL MİK değeri ile aynı etkiyi göstermiştir. Lin ve arkadaşlarına göre [32], şalkon yapısındaki bileşiklerde antitüberküler etki için, 2-propen-1-on yapısına bağlı halkalardan birinin lipofilik değerinin ise hidrofilik olması gerekmektedir. Bizim şalkon bileşiklerimizde 2-propen-1-on halkasına bağlı her iki halka fenildir ve bu halkalara bağlı süstituentler hidroksil, metoksil, klor ve bromdur. A halkasının 5. konumunda bulunan klor ve brom atomları lipofilitiyi artırıcı etki yapmasına rağmen, aynı halkada 2. konumda hidroksil grubunun varlığı hidrofiliteyi artırmaktadır. Ayrıca Lin ve arkadaşları [32] yapıda bulunan ilave hidroksil ve metoksil gruplarının antitüberküler etkide ciddi düşüşe yol açabileceğini söylemektedir. Bizim şalkon bileşiklerimizde bulunan fonksiyonel grupların hidrofobiditeyi olumsuz etkilediği ve bu nedenle de antitüberküler etkilerinin azalmış olabileceği söylenebilir.

B20 ve **B21** bileşikler *C. krusei* üzerine sırasıyla 16 µg/mL ve 32 µg/mL MİK değerleri ile en iyi etkiyi göstermişlerdir. **B19** bileşiği A halkasında 2-hidroksi-4-metoksi fenil grubu taşırken, **B20** bileşiği 2-hidroksi-5-bromo fenil grubu taşımaktadır. Bu iki bileşiğin B ve C halkası aynı grupları içermektedir. **B20** bileşiği **B19** bileşiğine göre *C. krusei* üzerine 4 kat daha etkili bulunmuştur. Bu da *C. krusei* üzerine etki söz konusu olduğunda A halkasının etkide önemli rol oynadığını göstermiştir. A halkasında metoksil grubu yerine bir halojen atomunun varlığının etkiyi dikkat çekici bir şekilde artırdığı saptanmıştır. Yine bu halojen atomunun klor yerine brom atomu olması da etkiyi artırmaktadır.

Sonuç olarak, sentez edilen bileşiklerin tüberküloz basili üzerinde çok önemli bir etkinliği görülmemiştir. Bununla birlikte bileşiklerimizin özellikle kandida türleri üzerinde iyi etki gösterdiği bulunmuştur. **B21** bileşiği *C. krusei* üzerine 16 µg/mL MİK değeri ile en etkili bileşik olarak bulunmuştur. **B19**, **B20** ve **B21** bileşikler ise *C. albicans* üzerine en iyi etkiyi gösteren bileşiklerdir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: *B.E.A., F.K.O., E.A., S.Ö.Ö.*; Tasarım: *B.E.A., F.K.O., E.A., S.Ö.Ö.*; Denetim: *B.E.A., F.K.O., E.A., S.Ö.Ö.*; Kaynaklar: *B.E.A., F.K.O.*; Malzemeler: *B.E.A., F.K.O.*; Veri toplama ve/veya

işleme: B.E.A., F.K.O., E.A., S.Ö.Ö.; Analiz ve/veya yorumlama: B.E.A., F.K.O.; Literatür taraması: B.E.A., F.K.O.; Makalenin yazılması: B.E.A.; Kritik inceleme: B.E.A., F.K.O., E.A.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Tsega, A., Mekonnen, F. (2019). Prevalence, risk factors and antifungal susceptibility pattern of *Candida* species among pregnant women at Debre Markos Referral Hospital, Northwest Ethiopia. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 19, 527-534.
2. Vanani, A.R., Mahdavinia, M., Kalantari, H., Khoshnood, S., Shirani, M. (2019). Antifungal effect of the effect of *Securigera securidaca* L. vaginal gel on *Candida* species. *Current Medical Mycology*, 5(3), 31-35.
3. Oyewole, O.A., Okoliegbe, I.N., Alkhalil, S., Isah, P. (2013). Prevalence of vaginal candidiasis among pregnant women attending Federal University of Technology, Minna, Nigeria, Bosso Clinic. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 4(1), 113-120.
4. Samaranayake, Y.H., Samaranayake, L.P. (1994). *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 41, 295-310.
5. Nobile, C.J., Johnson, A.D. (2015). *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annual Review of Microbiology*, 69, 71-92. Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M.F., Ilio, C.D. (2013). *Escherichia coli* in Europe: an overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 6235-6254.
6. Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M.F., Ilio, C.D. (2013). *Escherichia coli* in Europe: an overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 6235-6254.
7. Gül, M., Şensoy, A., Çetin, B., Korkmaz, F., Seber, E. (2004). Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında seftazidime duyarlılığın E-test ve disk diffüzyon yöntemleri ile araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 34, 33-36.
8. Güler, İ., Kılıç, H., Atalay, M.A., Perçin, D., Erçal, B.D. (2011). Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları. *Dicle Tıp Dergisi*, 38(4), 466-470.
9. Mert Dinç, B., Aykut Arca, E., Yağcı, S., Karabiber, N. (2009). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarında in-vitro antibiyotik duyarlılığı. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 66(3), 117-121.
10. Evranos Aksöz, B. (2014). Tüberküloz tedavisinde yeni ilaç adayları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 71(4), 207-220.

11. Kumar, K.A., Jayarooma, P. (2013). Pyrazoles: synthetic strategies and their pharmaceutical applications-an overview. *International Journal of PharmTech Research*, 5(4), 1473-1486.
12. Naim, M.J., Alam, O., Nawaz, F., Alam, J., Alam, P. (2016). Current status of pyrazole and its biological activities. *Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences*, 8(1), 2-17.
13. Kumar, S., Bawa, S., Drabu, S., Kumar, R., Gupta, H. (2009). Biological activities of pyrazoline derivatives -a recent development. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 4(3), 154-163.
14. Karrouchi, K., Radi, S., Ramli, Y., Taoufik, J., Mabkhot, Y.N., Al-aizari, F.A., Ansar, M. (2018). Synthesis and pharmacological activities of pyrazole derivatives: a review. *Molecules*, 23, 134-218.
15. Evranos-Aksoz, B., Ucar, G., Tas, S.T., Aksoz, E., Yelekci, K., Erikci, A., Sara, Y., Iskit, A.B. (2017). New human monoamine oxidase A inhibitors with potential antidepressant activity: design, synthesis, biological screening and evaluation of pharmacological activity. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 20(6), 461-473.
16. Gomes, M.N., Muratov, E.N., Pereira, M., Peixoto, J.C., Rosseto, L.P., Cravo, P.V.L., Andrade, C. H., Neves, B. J. (2017). Chalcone derivatives: promising starting points for drug design. *Molecules*, 22(8), 1210.
17. Evranos Aksöz, B., Ertan, R. (2011). Chemical and structural properties of chalcones I. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36, 223-242.
18. Zhuang, C., Zhang, W., Sheng, C., Zhang, W., Xing, C., Miao, Z. (2017). Chalcone: a privileged structure in medicinal chemistry. *Chemical Reviews*, 117(12), 7762-7810.
19. Sahu, N.K., Balbhadra, S.S., Choudhary, J., Kohli, D.V. (2012). Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. *Current Medicinal Chemistry*, 19, 209-225.
20. Lin, Y.M., Zhou, Y., Flavin, M.T., Zhou, L.M., Nie, W., Chen, F.C. (2002). Chalcones and flavonoids as anti-tuberculosis agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 10, 2795-2802.
21. Jayasinghe, L., Balasooriya, B.A., Padmini, W.C., Hara, N., Fujimoto, Y. (2004). Geranyl chalcone derivatives with antifungal and radical scavenging properties from the leaves of *Artocarpus nobilis*. *Phytochemistry*, 65, 1287-1290.
22. Svetaz, L., Tapia, A., López, S.N., Furlán, R.L., Petenatti, E., Pioli, R., Schmeda-Hirschmann, G., Zacchino, S.A. (2004). Antifungal chalcones and new caffeic acid esters from *Zuccagnia punctata* acting against soybean infecting fungi. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52, 3297-3330.
23. Özdemir, A., Turan-Zitouni, G., Kaplancıklı, Z.A., Revial, G., Demirci, F., İşcan, G. (2010). Preparation of some pyrazoline derivatives and evaluation of their antifungal activities. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 25(4), 565-571.
24. Jimenez, C.M., Sampietro, D.A., Sgariglia, M.A., Soberón, J.R., Vattuone, M.A. (2014). Isolation, identification and usefulness of antifungal compounds from *Zuccagnia punctata* for control of toxigenic ear rot pathogens. *Natural Products Communications*, 9, 1461-1464.
25. Koudokpon, H., Armstrong, N., Dougnon, T.V., Fah, L., Hounsa, E., Bankolé, H.S., Loko, F., Chabrière, E., Rolain, J.M. (2018). Antibacterial activity of chalcone and dihydrochalcone compounds from *Uvaria chamae* roots against multidrug-resistant bacteria. *BioMed Research International*, 2018, 1453173.

26. Xu, M., Wu, P., Shen, F., Ji, J., Rakesh, K.P. Chalcone derivatives and their antibacterial activities: Current development. (2019). *Bioorganic Chemistry*, 91, 103133.
27. Ni, L., Meng, C.Q., Sikorski, J.A. (2004). Recent advances in therapeutic chalcones. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 14(12), 1669-1691.
28. Evranos-Akşöz, B., Baysal, I., Yabanoglu-Ciftci, S., Djikić, T., Yelekci, K., Ucar, G., Ertan, R. (2015). Synthesis and screening of human Monoamine oxidase-A inhibitor effect of new 2-pyrazoline and hydrazone derivatives. *Archive Der Pharmazie*, 348, 743-756.
29. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS). (2006a). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 6th informational supplement. CLSI M100-S16, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA.
30. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS). (2006b). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast approved standard, M27-A, clinical and laboratory standards institute, 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA.
31. Franzblau, S.G., Witzig, R.S., McLaughlin, J.C., Torres, P., Madico, G., Hernandez, A., Degnan, M.T., Cook, M.B., Quenzer, V.K., Ferguson, R.M., Gilman, R.H. (1998). Rapid, low-technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the microplate alamar blue assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 362-366.
32. Lin, Y.M., Zhou, Y., Flavin, M.T., Zhou, L.M., Nie, W., Chen, F.C. (2002). Chalcones and flavonoids as anti-tuberculosis agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 10, 2795-2802.



BETA-SITOSTEROL AND ITS ANTINOCICEPTIVE MECHANISM ACTION

BETA-SİTOSTEROL VE ANTİNOSESİPTİF ETKİ MEKANİZMASI

Ayşe Arzu ŞAKUL¹ , Mehmet Evren OKUR^{2*} 

¹ Istanbul Medipol University, School of Medicine, Department of Medical Pharmacology, 34810,
Istanbul, Turkey

² University of Health Sciences, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, 34668,
Istanbul, Turkey

ABSTRACT

Objective: *In this study, the possible central antinociceptive activity of beta-sitosterol is investigated along with its association of stimulation of opioidergic, serotonergic, adrenergic, and cholinergic receptors to mice central analgesia because of the beta-sitosterol administration.*

Material and Method: *The beta-sitosterol was administrated to mice in various doses, such as 5, 10 and 20 mg/kg. Then, the mice analyzed via hot-plate and tail-flick assay to investigate the possible antinociceptive effects of beta-sitosterol. Additionally, in order to associate the mechanism of action mechanism, 20 mg/kg of beta-sitosterol was intraperitoneally administered to the animal which were previously pre-treated with opioid antagonist naloxone (5 mg/kg), serotonin 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist ketanserin (1 mg/kg), serotonin 5-HT₃ receptor antagonist – ondansetron (1 mg/kg), α₂-adrenoceptor antagonist yohimbine (1 mg/kg) and muscarinic antagonist atropine (5 mg/kg), as well as nicotinic antagonist mecamylamine (1 mg/kg).*

Result and Discussion: *The antinociceptive effect of beta-sitosterol was confirmed as dose-dependent for 5, 10, and 20 mg/kg doses in tail-flick and hot-plate tests. It can be concluded that beta-sitosterol promotes central antinociception effects associated with the spinal and supraspinal mediated cholinergic and opioidergic modulation.*

Keywords: *Antinociception, beta-sitosterol, cholinergic receptors, opioidergic receptors*

ÖZ

Amaç: *Bu çalışmada, farelerde beta-sitosterol uygulamasına bağlı santral analjezide opioidergik, serotonergik, adrenergik ve kolinerjik reseptörleri ile ilişkili olası antinosiseptif aktivitesi araştırılmıştır.*

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Mehmet Evren Okur
e-mail / e-posta: evrenokurecz@gmail.com, **Phone / Tel.:** +902164189616

Gereç ve Yöntem: Beta-sitosterol, farelere 5, 10 ve 20 mg/kg dozlarında uygulandı. Daha sonra, fareler beta-sitosterolün olası antinosisseptif etkilerini araştırmak için tail-flick ve hot-plate testleri ile analiz edildi. Ek

olarak, etki mekanizmasını değerlendirmek için, farelere, beta-sitosterol (20 mg/kg, intraperitoneal) uygulamasından önce opioid antagonisti nalokson (5 mg/kg), serotonin 5-HT₃ reseptör antagonisti ondansetron (1 mg/kg), serotonin 5-HT_{2A/2C} reseptör antagonisti ketanserin (1 mg/kg), α₂-adrenoseptör antagonisti yohimbine (1 mg/kg) ve muskarinik antagonist atropin (5 mg/kg) ve ayrıca nikotinik antagonisti mekamilamin (1 mg/kg) uygulandı.

Sonuç ve Tartışma: Beta-sitosterolün doza-bağlı antinosisseptif etkisi, tail-flick ve hot-plate testlerinde 5, 10 ve 20 mg/kg dozlarında tespit edilmiştir. Beta-sitosterolün, spinal ve supraspinal aracılı kolinerjik ve opioidderjik modülasyon ile ilişkili merkezi antinosisepsiyon etkilerini teşvik ettiği sonucuna varılabilir.

Anahtar Kelimeler: Antinosisepsiyon, beta-sitosterol, kolinerjik reseptörler, opioidderjik reseptörler

INTRODUCTION

Last years, various management techniques of pain have been arisen in order to offer patients life quality. Such strategies include pharmacological approaches using pain relief medications, physical therapy, complementary therapies as meditation etc. The diagnosis of pain and the recognition of analgesia methods and pain management are very significant for both clinicians and emergency department doctors [1]. There are 4 categories of pain such as acute, nociceptive, chronic, and neuropathic. Nociceptive pain arise from the neural pathways activity due to actual tissue damage or possible tissue-damaging stimuli [2]. Nociceptors receptors could be activated from acute noxious stimuli i.e. heat or cold temperatures, mechanical force, or chemical stimulation [3–5]. Thus, pharmacological agents presenting with antinociceptive properties are of high clinical importance. The application of pharmacological compounds derived from plants, is widely tested in clinical practice.

Beta-sitosterol (BS) is a chemical compound (Figure 1) widely found in plants such as *Uncaria* species (*tomentosa*, *guianensis*) [6, 7] and vegetables i.e. rice [8], wheat [9], seeds and nuts [10] etc. BS has shown interesting curative properties such as anti-inflammatory, anti-viral, anti-cancer as well as immune boost [11–13]. The chemical structure of BS has been correlated with the structure of cholesterol; therefore, Tapiero et al. has reported that BS interferes with absorption of cholesterol in the intestines, and prevents cholesterol levels from being arisen in serum. Additionally, tumor growth inhibition by BS has been related with the effect of the sterol on sphingomyelin cycle and increased production of ceramide [14]. Other studies have included the antibacterial activity of BS [15] as well as its gastro- and hepatic-protective effects [16].

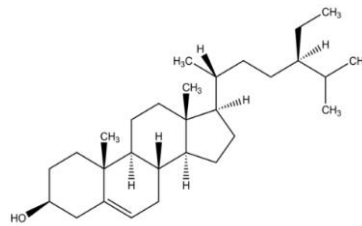


Figure 1. Chemical Structure of beta-sitosterol

Most importantly, BS is reported to modulate immune function, inflammation [17], and pain levels through the production of inflammatory cytokines [18]. In general, the biological properties of BS have not been widely explored. In this study, the exploration of BS as pharmacological compound with antinociceptive properties is performed; mice models were administered with BS and studied for their behavior with the hot-plate and tail-flick assays.

MATERIAL AND METHOD

Chemicals and Materials

Beta-sitosterol, tween 80, yohimbine hydrochloride, diclofenac sodium, ketanserin tartrate, mecamlamine hydrochloride, naloxone hydrochloride, atropine sulfate, and ondansetron were purchased from Sigma, Germany. Herein, the used chemical components or solvents are of analytical grade. If they are not, they are stated accordingly.

Animals

Male Balb/C mice (20–25 g) were applied as animal models. The animals were kept at İstanbul Medipol University, in a room with controlled temperature ($22\pm 2^\circ\text{C}$) and humidity (55–70%) at 12 h light/dark cycles. Poly(propylene) boxes were used to maintain the mice containing wood shavings at the base of the box; the animals had free access to food and filtered water. Moreover, animals spread equally among the groups. Two hours before starting the experiments, the mice permitted to acclimatize to the air-conditioned. This was taken place during the light cycle phase. The experiment performed between 8.00 and 12.00 a.m. and the animals only intake water during the six hours prior to the experimental procedures. This choice based on the assumption that animals can present food interactions with BS. The animal care conditions as well as research protocols were chosen according to the principles and guidelines from the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The protocol confirmed by the Ethical Committee of İstanbul Medipol University (2020/69).

Drugs and pharmacological procedures

The animals were randomly allocated to 19 groups (n=6 per group). Beta-sitosterol and diclofenac were dissolved in the vehicle. Diclofenac (5 mg/kg, i.p.) was administrated as the reference drug. In further, BS was also i.p. administered (1% Tween 80 in distilled water) at the doses of 5, 10, and 20 mg/kg. Moreover, intraperitoneal injections of the antagonists were chosen. The action mechanisms were investigated by pre-treating the mice with muscarinic receptor antagonist; Atropine (5 mg/kg), nicotinic receptor antagonist; Mecamlamine (1 mg/kg), serotonin 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist; Ketanserin (1 mg/kg), serotonin 5-HT₃ receptor antagonist; Ondansetron (1 mg/kg), opioid antagonist; Naloxone (1 mg/kg), and α_2 -adrenoceptor antagonist; Yohimbine (1 mg/kg) at 20, 30, 30, 30 and 15 min before the administration of BS, respectively. Before any combination studies were conducted, the antinociceptive effect of the antagonist agents when administered alone was examined

in the mouse hot-plate and tail-flick assay. Hot-plate and tail-flick tests (90 min after BS administration) were performed in order to measure the pain threshold. The dosages and drug administration schedules were chosen according to previous reports [19–21].

Pharmacological tests

Hot-plate test

A hot-plate test was applied in order to examine the antinociceptive effect of BS. The choice of animals for the hot-plate test was based on their response time of up to 15 s such as to thermal stress. The animal selection was done the previous day of the experiment. A hot-plate analgesia meter was utilized to measure the pain reflexes in response to thermal stimuli (Ugo Basile Instruments, Comerio, Italy). The mice from each party were put on the pre-heated plate ($55\pm 0.5^\circ\text{C}$). As reaction time was taken, the latency of licking or flicking of its hind paw or jumping upward. The 20 s were chosen as cut-off time in order to minimize hind paw damage. Finally, the mice behavior was recorded before treatment and after treatment [20].

Tail-flick test

The tail-flick latency was obtained using a tail-flick unit (Ugo Basile, Italy). Every animal settled to a certain way in order to tails project towards the nichrome wire. Moreover, the distal part of the tail (almost 2-3 cm lower portion of the tail) positioned upon the nichrome wire through which current flow set at 6 amp. The stimulus in this assay, was the radiant heat while the “tail-flick” response as well as “endpoint” was the immediate withdrawal of tail. In further, as “reaction time” was considered the time between placing the tail on heat and immediate removal of the tail. Additionally, the assay terminated if the latency exceeded for more than 15 s (cut-off time).

The later formula was applied in order to calculate maximal possible effect (MPE%) according to the results obtained by the hot-plate and tail-flick assays [22, 23]. The maximal possible effect percentage ascertained by the response latency against thermal stimulus:

$$\text{MPE\%} = \left[\frac{\{(\text{Post-drug latency}) - (\text{Pre-drug latency})\}}{\{(\text{Cut-off time}) - (\text{Pre-drug latency})\}} \right] \times 100$$

Statistical analysis

The statistical analyses were performed with GraphPad Prism 7.0 software, Inc., San Diego, CA. The obtained data expressed as mean \pm SEM. Finally, the statistical analysis of the data was performed via one-way ANOVA which was followed by post hoc (Tukey’s) analysis. As statistical significant, the $p < 0.05$ was chosen.

RESULT AND DISCUSSION

Antinociceptive effect of beta-sitosterol

Figure 2 presents the antinociceptive effects of BS according to hot-plate and tail-flick assays. Accordingly, it can be seen that diclofenac used as the reference drug, significantly hindered the pain response in comparison with the control group. This significant inhibition of pain response was recorded for both hot-plate ($p < 0.001$) and tail-flick ($p < 0.001$) tests. Moreover, the application of BS at doses of 20 mg/kg ($p < 0.05$) induced a notable as well as a dose-dependent increment in the mean basal reaction time in hot-plate and tail-flick tests, in comparison with the control group. Consequently, the obtained data clearly demonstrated that administration of 20 mg/kg of BS was remarkably more efficacious than the application of lower doses (5, 10 mg/kg) of BS and the control group as well.

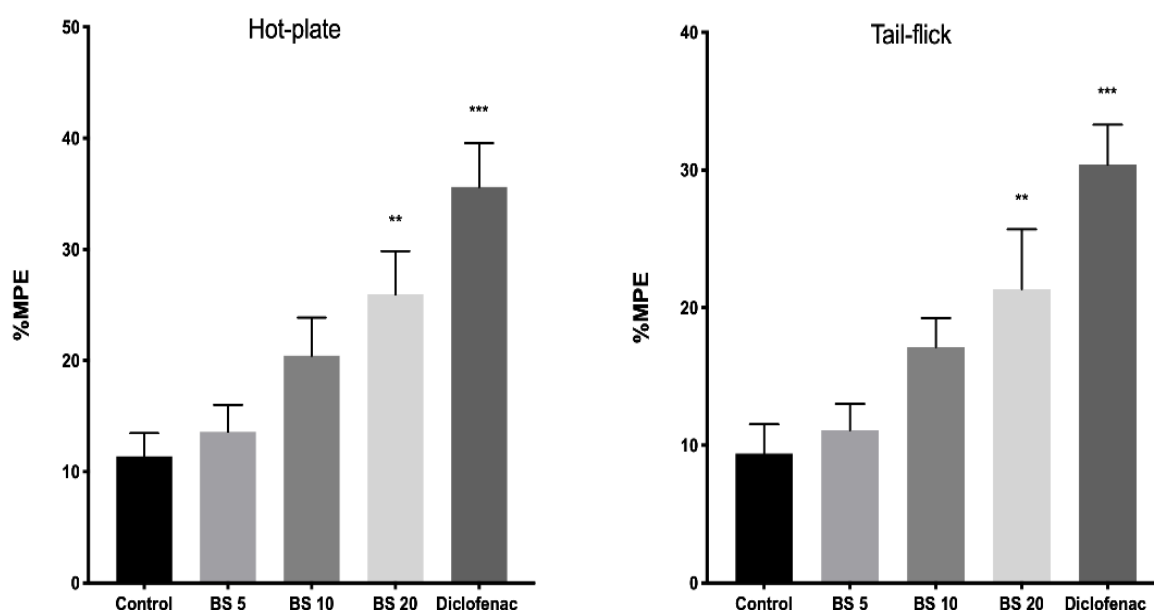


Figure 2. Antinociceptive effects of 5, 10, and 20 mg/kg (i.p.) beta-sitosterol (BS) and 5 mg/kg diclofenac (i.p.) in the hot-plate (hind paw withdrawal, licking or jumping) and tail-flick assays. Statistically significant difference; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control. Data are shown as mean \pm S.E.M. MPE: Maximal possible antinociceptive effect.

Evaluation of the mechanism of antinociceptive activity of Beta-sitosterol

Figure 3 reveals the reversal effect of atropin on antinociception induced by BS (20 mg/kg). Pre-treatment with atropin caused the reverse of the pain relief effects of the BS in the hot-plate ($p < 0.001$) and the tail-flick ($p < 0.001$) assays.

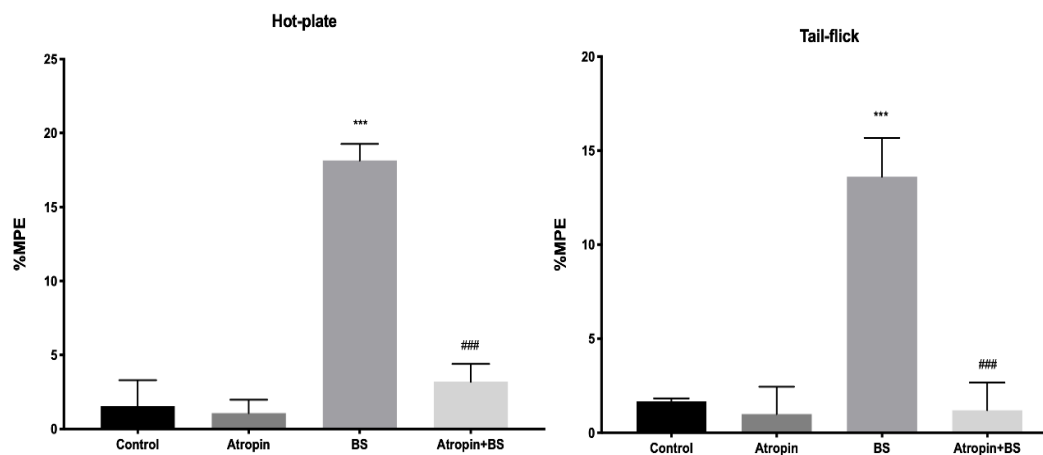


Figure 3. Effects of atropine (i.p.-5mg/kg) on the antinociception of beta-sitosterol (BS) (i.p.-20mg/kg) in the hot-plate (hind paw withdrawal, licking or jumping) and tail-flick assays. Statistically significant difference; *** $p < 0.001$ vs. control; ### $p < 0.001$ vs. beta-sitosterol alone. Data are shown as mean \pm S.E.M. MPE: Maximal possible antinociceptive effect.

As it can be seen from Figure 4, the single administration of mecamlamine (1 mg/kg, i.p.) failed to show significance compared to the control group. Importantly, intraperitoneal pre-treatment with 1 mg/kg mecamlamine significantly reversed the antinociceptive action of BS (20 mg/kg) in the hot-plate ($p < 0.001$) and tail-flick ($p < 0.001$) tests in comparison with the BS alone.

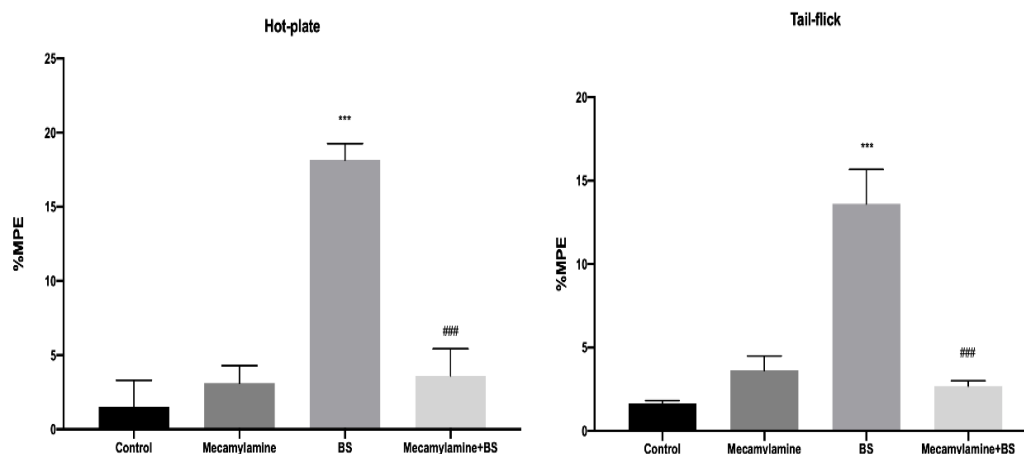


Figure 4. Effects of mecamlamine (i.p.-1mg/kg) on the antinociception of beta-sitosterol (BS) (i.p.-20mg/kg) in the hot-plate (hind paw withdrawal, licking or jumping) and tail-flick assays. Statistically significant difference; *** $p < 0.001$ vs. control; ### $p < 0.001$ vs. beta-sitosterol alone. Data are shown as mean \pm S.E.M. MPE: Maximal possible antinociceptive effect.

The effect of ketanserin treatment on tail-flick and hot-plate tests was intended to be clarified via the single administration of ketanserin (1 mg/kg); nonetheless, the administration did not cause any significant difference in antinociceptive response (Figure 5). The results indicate that ketanserin also did not reverse the antinociceptive effect observed for BS in a significant way.

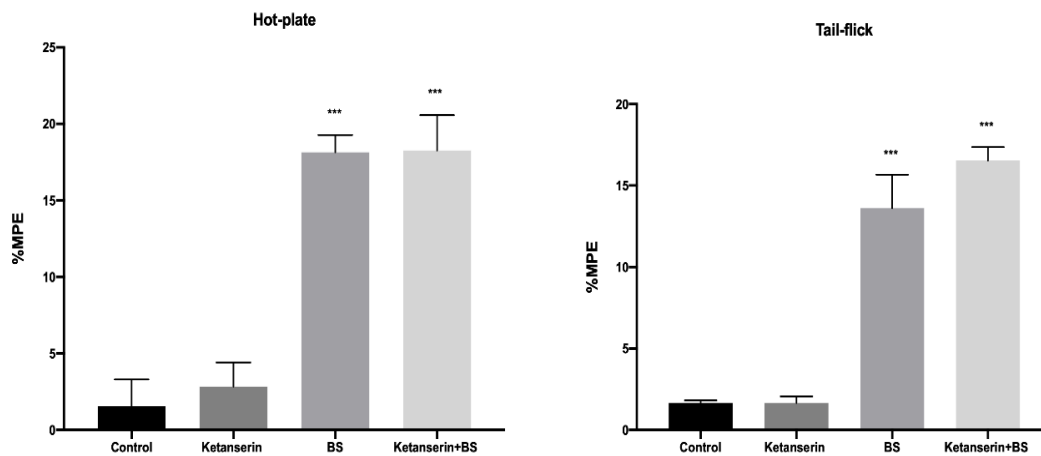


Figure 5. Effects of ketanserin (i.p.-1mg/kg) on the antinociception of beta-sitosterol (BS) (i.p.-20mg/kg) in the hot-plate (hind paw withdrawal, licking or jumping) and tail-flick assays. Statistically significant difference; *** $p < 0.001$ vs. control. Data are shown as mean \pm S.E.M. MPE: Maximal possible antinociceptive effect.

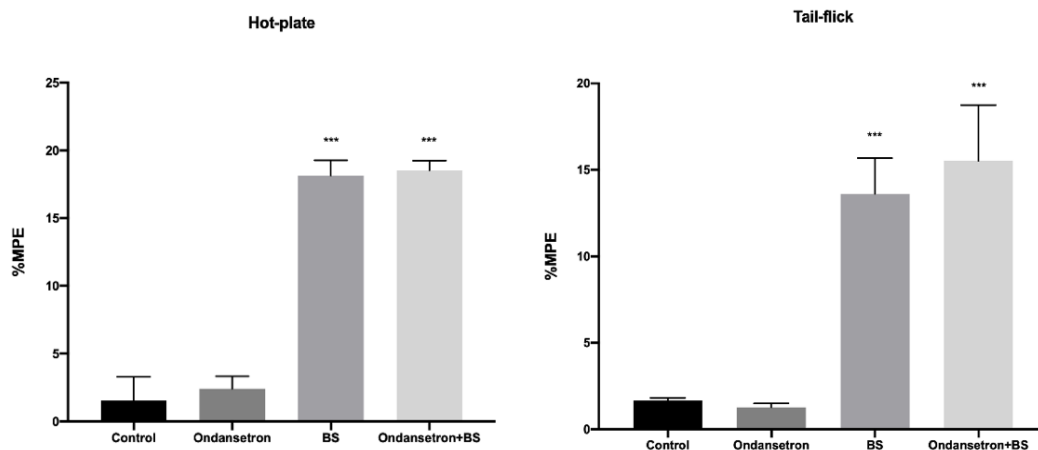


Figure 6. Effects of ondansetron (i.p.-5mg/kg) on the antinociception of beta-sitosterol (BS) (i.p.-20mg/kg) in the hot-plate (hind paw withdrawal, licking or jumping) and tail-flick assays. Statistically significant difference; *** $p < 0.001$ vs. control. Data are shown as mean \pm S.E.M. MPE: Maximal possible antinociceptive effect.

As depicted in Figure 6, the administration of intraperitoneal injection of 5 mg/kg ondansetron did not modify the antinociceptive activity of BA (20 mg/kg) in the hot-plate and tail-flick assays. Moreover, ondansetron pre-treatment did not significantly decrease in latency of the BA-mediated analgesic responses according to the hot-plate and tail-flick procedures.

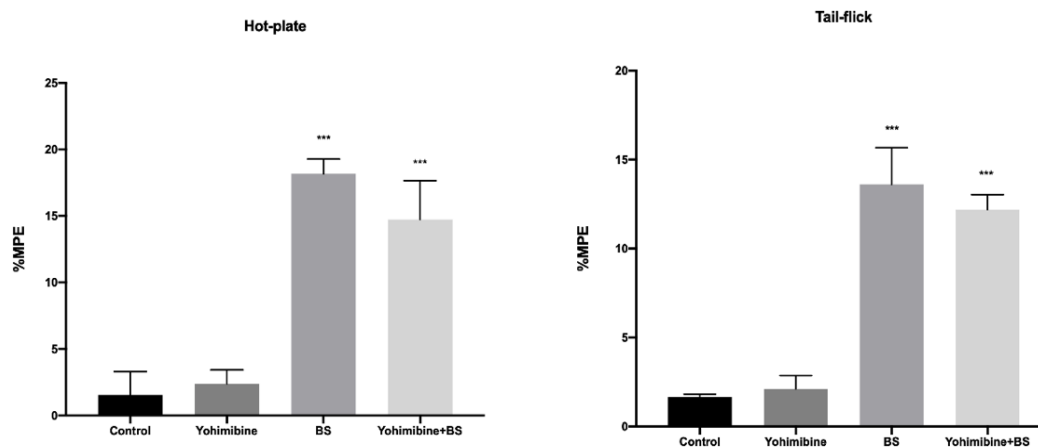


Figure 7. Effects of yohimbine (i.p.-1mg/kg) on the antinociception of beta-sitosterol (BS) (i.p.-20mg/kg) in the hot-plate (hind paw withdrawal, licking or jumping) and tail-flick assays. Statistically significant difference; *** $p < 0.001$ vs. control. Data are shown as mean \pm S.E.M. MPE: Maximal possible antinociceptive effect.

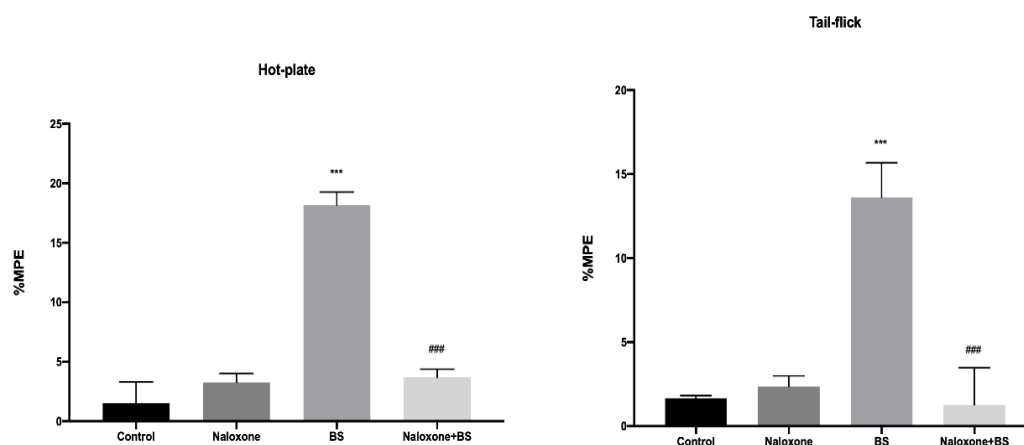


Figure 8. Effects of naloxone (i.p.-5mg/kg) on the antinociception of beta-sitosterol (BS) (i.p.-20mg/kg) in the hot-plate (hind paw withdrawal, licking or jumping) and tail-flick assays. Statistically significant difference; *** $p < 0.001$ vs. control; ### $p < 0.001$ vs. beta-sitosterol alone. Data are shown as mean \pm S.E.M. MPE: Maximal possible antinociceptive effect.

Figure 7 shows that pre-treatment with only yohimbine (1 mg/kg, i.p.) have not employed any antinociceptive effect in both hot-plate and tail-flick tests. Moreover, the pre-treatment with yohimbine have not reduced the BS-induced acute thermal antinociceptive effect according to the data obtained by the hot-plate or tail-flick tests.

Figure 8 depicts the involvement of opioid receptors in the antinociceptive effects of BS assessed using hot-plate and tail-flick tests, respectively. The treatment of mice with naloxone (5 mg/kg, i.p.) have not significantly altered the latency response in the hot-plate and tail-flick assays. On the other hand, the pre-treatment with the non-selective opioid antagonist, naloxone, importantly blocked BS-induced antinociception in the hot-plate ($p < 0.001$) and tail-flick ($p < 0.001$) tests in comparison with BS alone.

Phytosterol phytochemicals such as BS present a similar structure to cholesterol. BS can be characterized as one of the common and major phytosterol with numerous biological activities. Consequently, BS is a drastic pharmacological agent with protective activities against chronic disorders, oxidative stress, and neoplasm [24]. Besides, various scientific data derived from reports report that BS present anti-diabetic, anti-inflammatory, chemopreventive and anticancer properties [25]. Nevertheless, the investigation on the effect of BS at molecular level remains unclear. The present study demonstrates that BS at 20 mg/kg (i.p.) displays anti-nociceptive activity, whereas the obtained data might evidence the implicated mechanisms of that activity.

Herein, the antinociceptive effect of BS was examined via two known methodologies involving stimuli. The two methods, hot-plate and tail-flick assays involve the thermal stimuli which stimulate the A δ fibers. Nonetheless, both of tests note different neural pathways. More specifically, the tail-flick is a spinal reflex [26]. On the other hand, the hot-plate response is under supraspinal control given that the hot-plate assay is a specific centrally antinociceptive activity assay [19]. According to Wang et al., the hot-plate assay considered to engage in supraspinal sites since only the administration of central analgesics enlarge the response time during the experimental [27].

Dighe et al. previously reported that BS (5, 10 and 20 mg/kg, i.p.) isolated from leaves of *Oxalis corniculata*, displayed promising dose-dependent central-mediated analgesic activity in rodents, according to the data obtained by hot plate test and acetic acid-induced writhing test. The data compared to active drug, pentazocine [19]. Furthermore, Scapinello et al. demonstrated that various plant extracts including BS, stigmasterol, and the isolated components depicted antinociceptive effects in mice, according to stimuli responsive tests as formalin, writhing, and hot-plate [28]. Various pharmacological approaches have revealed that Cyclooxygenase (COX)-mediated peripheral nociceptive mechanisms contribute to pain [29]. Subsequently, data obtained via in vitro COX inhibition assay confirm the in vivo system via the acetic acid-mediated peripheral nociceptive pain remedy [30]. A past study revealed that BS isolated from *Nyctanthes arbor-tristis* leaves can provide protection against peripheral

nociceptive pain in a dose dependent manner [31]. The data are related with our study, given that as BS dose increased, antinociception also determined. Moreover, herein, the determination of the involved mechanism to the central antinociception caused by BS, was carried out by using numerous typical antagonists of serotonergic, noradrenergic, opioid, and cholinergic receptors.

It is known that muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors mediate the integrative activity of acetylcholine in numerous brain functions as cognition, attention, emotion, and synaptic plasticity. Moreover, recent data has recommended that the aforementioned receptors might involve in supraspinal pain modulation excepts the known local peripheral and spinal contributions in mediating pain [32]. Besides, muscarinic acetylcholine receptors are broadly categorized as pharmacologic targets for pain relief while the majority of those focused on central nervous system muscarinic acetylcholine receptors [33].

From the obtained data, cholinergic receptors are being involved in antinociception considering that atropine reversed the antinociception of BS. Spinal cord is a major action target for cholinomimetics in analgesia. It has been suggested that painful stimuli improve acetylcholine in the spinal cord. Therefore, the stimulation of muscarinic receptors in the spinal cord leads to a great discharge of inhibitory transmitters associated with reductions in the secretion of excitatory transmitters; this fact mediates their antinociception [34].

In further, it should be mentioned that the cholinergic system present plethora of therapeutic targeted sites against numerous clinically relevant pain states. Guginski et al. proposed that acetylcholine mediates its effects through both nicotinic acetylcholine receptors (ligand-gated ion channels) and the G protein-coupled muscarinic receptors [35]. It can be evidenced, that the cholinergic system involves into the antinociception caused by BS, according to the obtained results after mecamylamine administration at a dose similar to that known to prevent antinociception induced by nicotinic receptor agonist. Besides, a number of studies reported that $\alpha_4\beta_2$ ligands present antinociceptive effects in relevance with their action on spinal and supraspinal pathways. The $\alpha_4\beta_2$ receptors can be ascertained to various brain areas, including the nucleus raphe magnus, midbrain periaqueductal gray, and locus coeruleus [36].

In addition, the findings obtained have shown that the effects of the BS tend to include the involvement of the opioid system. It is reported that the opioids perform their analgesic activity through the spinal (μ_2 , κ_1 , δ_2) receptors and supraspinal (μ_1 , κ_3 , δ_1 , σ_2) [19]. Naloxone is a specific opioid receptor antagonist in the central nervous system, able to restrict the effect of anesthetics, such as morphine [28]. Therefore, naloxone was applied in order to examine the opioid effect of BS and effect of naloxone on beta-sitosterol on thermic stimulus-induced pain involvement in the mechanism of antinociceptive action. BS was applied following naloxone (1 mg/kg, s.c.) administration according to previous report

studying the involvement of opioid receptors. It was revealed that naloxone reversed its antinociceptive activity [19].

The noradrenergic receptor system seems to play a major role in nociception and antinociception in various species. The noradrenergic receptor system comprises the endogenous ligand nor-adrenaline and its receptors. It is reported that term “noradrenergic” mostly refers to alpha-, while adrenergic refers to beta-adrenergic receptors; although, nor-adrenaline can bind to β -adrenergic receptors. This fact is related to the lower binding affinity of noradrenaline to beta-adrenergic than alpha-adrenergic receptors [37]. According to this assumption, the term noradrenergic receptor system was chosen for this study. Noradrenergic receptor system is targeted by α_2 adrenergic molecules such as clonidine, dexmedetomidine and xylazine which are agonists and antagonists such as yohimbine [38]. Consequently, in order to examine the involvement of antagonism in antinociception, a dose of 1 mg/kg yohimbine was administered. The chosen dose has not significantly affected the pain-related behavior of animals, according to control. When BS administered in 20 mg/kg dose, the application of yohimbine did not reverse the antinociceptive effect followed by BS dose.

Numerous studies have demonstrated that serotonin regulates nociceptive reaction by 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, and 5-HT₇ receptors in the central nervous system [39]. Consequently, serotonin receptors might involve to nociceptive response. Moreover, pain perception can be altered via inhibitory descending ways from the central nervous system and especially serotonin. The inhibition of pain transmission can occur via the activation of descending ways from the raphe nuclei to the dorsal horn of spinal cord, mediated via serotonin. In case of peripheral level, serotonin might involve with pain signalization [40]. According to the results of hot-plate and tail-flick tests, ketanserin and ondansetron which are the selective antagonists of 5-HT_{2A/2C} and 5-HT₃ receptors, have not blocked the reduction in nociceptive response induced by BS (20 mg/kg). Subsequently, the serotonergic system has not involved in the antinociceptive action of BS.

From the present study, involving the test of beta-sitosterol as antinociceptive agent according to hot-plate and tail-flick tests, it can be concluded that BS present an antinociceptive effect on nociception-induced tests. Although, future studies will allow determining the involved mechanisms, a contribution of the opioid and cholinergic systems in the antinociceptive action of beta-sitosterol can be ascertained. Finally, more studies would be able to exert the favorable role of beta-sitosterol to pain control and management.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception: *A.A.Ş., M.E.O.*; Design: *A.A.Ş., M.E.O.*; Supervision: *A.A.Ş., M.E.O.*; Resources: *A.A.Ş., M.E.O.*; Materials: *A.A.Ş., M.E.O.*; Data collection and/or processing: *A.A.Ş., M.E.O.*; Analysis

and/or interpretation: A.A.Ş., M.E.O.; Literature search: A.A.Ş., M.E.O.; Writing manuscript: A.A.Ş., M.E.O.; Critical review: A.A.Ş., M.E.O.; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

The protocol confirmed by the Ethical Committee of İstanbul Medipol University (2020/69).

REFERENCES

1. Çarıkçı, A., Uçar, F., Yalçın, H. T. (2008). Kozmetik ürünlerde bakteriyal ve fungal kompozisyonun klasik yöntemler ve pcr yöntemi kullanılarak saptanması. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 6(01), 1–16.
2. Abdolrazaghnejad, A., Banaie, M., Tavakoli, N., Safdari, M., Rajabpour-Sanati, A. (2018). Pain management in the emergency department: a review article on options and methods. *Advanced Journal of Emergency Medicine*, 2(4), e45. doi: 10.22114/AJEM.v0i0.93.
3. Nicholson, B. (2006). Differential diagnosis: nociceptive and neuropathic pain. *The American Journal of Managed Care*, 12(9), 256–262.
4. Mitsi, V., Zachariou, V. (2016). Modulation of pain, nociception, and analgesia by the brain reward center. *Neuroscience*, 338, 81–92.
5. Falk, S., Dickenson, A.H. (2014). Pain and nociception: mechanisms of cancer-induced bone pain. *Journal of Clinical Oncology*, 32(16), 1647–1654.
6. Armstrong, S., Herr, M. (2020). Physiology, Nociception. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls.
7. Prieto Rodríguez, J.A., Patiño Ladino, O.J., Lesmes, L., Lozano, J.M., Cuca Suárez, L.E. (2011). Phytochemical study of uncaria guianensis leaves and antibacterial activity evaluation. *Acta Amazonica*, 41(2), 303–310.
8. Yepes-Pérez, A.F., Herrera-Calderon, O., Sánchez-Aparicio, J.E., Tiessler-Sala, L., Maréchal, J.D., Cardona-G, W. (2020). Investigating potential inhibitory effect of uncaria tomentosa (cat's claw) against the main protease 3CLpro of SARS-CoV-2 by molecular modeling. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 4932572.
9. Vissers, M.N., Zock, P.L., Meijer, G.W., Katan, M.B. (2000). Effect of plant sterols from rice bran oil and triterpene alcohols from sheanut oil on serum lipoprotein concentrations in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(6), 1510–1515.

10. Elkeilsh, A., Awad, Y.M., Soliman, M.H., Abu-Elsaoud, A., Abdelhamid, M.T., El-Metwally, I.M. (2019). Exogenous application of β -sitosterol mediated growth and yield improvement in water-stressed wheat (*Triticum aestivum*) involves up-regulated antioxidant system. *Journal of Plant Research*, 132(6), 881–901.
11. Delgado-Zammarreno, M.M., Bustamante-Rangel, M., Martinez-Pelarda, D., Carabias-Martinez, R. (2009). Analysis of beta-sitosterol in seeds and nuts using pressurized liquid extraction and liquid chromatography. *Analytical Sciences*, 25(6), 765–768.
12. Kim, S.-J. (2017). The ameliorative effect of β -sitosterol on DNCB-induced atopic dermatitis in mice. *Biomedical Science Letters*, 23(4), 303–309.
13. Saeidnia, S., Manayi, A., Gohari, A.R., Abdollahi, M. (2014). The story of beta-sitosterol- a review. *European Journal of Medicinal Plants*, 4(5), 590–609.
14. Heitzman, M., Neto, C.C., Winiarz, E., Vaisberg, A.J., Hammond, G.B. (2005). Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of (Rubiaceae). *Phytochemistry*, 66(1), 5–29.
15. Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D. (2003). Phytosterols in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(8), 321–325.
16. Ododo, M.M., Choudhury, M.K., Dekebo, A.H. (2016). Structure elucidation of β -sitosterol with antibacterial activity from the root bark of *Malva parviflora*. *Springerplus*, 5(1), 1210.
17. Feng, S., Dai, Z., Liu, A.B., Huang, J., Narsipur, N., Guo, G., Guo, G., Kong, B., Reuhl, K., Lu, W., Luo, Z., Yang, C.S. (2018). Intake of stigmasterol and β -sitosterol alters lipid metabolism and alleviates NAFLD in mice fed a high-fat western-style diet. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1863(10), 1274–1284.
18. Liu, R., Hao, D., Xu, W., Li, J., Li, X., Shen, D., Sheng, K., Zhao, L., Xu, W., Gao, Z., Zhao, X., Liu, Q., Zhang, Y. (2019). β -Sitosterol modulates macrophage polarization and attenuates rheumatoid inflammation in mice. *Pharmaceutical Biology*, 57(1), 161–168.
19. Paniagua-Pérez, R., Flores-Mondragón, G., Reyes-Legorreta, C., Herrera-López, B., Cervantes-Hernández, I., Madrigal-Santillán, O., Morales-González, J.A., Álvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E. (2016). Evaluation of the anti-inflammatory capacity of beta-sitosterol in rodent assay. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(1), 123–130.
20. Dighe, S. B., Kuchekar, B. S., Wankhede, S. B. (2019). Analgesic and anti-inflammatory activity of β -sitosterol isolated from leaves of *Oxalis corniculata*. *International Journal of Pharmacological Research*, 09(05), 109–113.
21. Arslan, R., Bektas, N. (2015). Evaluation of the centrally-acting mechanisms of some non-steroidal anti-inflammatory drugs. *American Journal of Pharmacy & Health Research*, 3(6), 191–202.
22. Arslan, R., Aydin, S., Nemutlu Samur, D., Bektas, N. (2018). The possible mechanisms of protocatechuic acid-induced central analgesia. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(4), 541–545.
23. Majumder, R., Adhikari, L., Dhara, M., Sahu, J. (2020). Evaluation of anti-inflammatory, analgesic and TNF- α inhibition (upon RAW 264.7 cell line) followed by the selection of extract (leaf and stem) with respect to potency to introduce anti-oral-ulcer model obtained from *Oxalis*

- psittacorum (Lam.) Vahl in addition to GC-MS illustration. *Journal of Ethnopharmacology*, 263, 113146.
24. De Caro, C., Raucci, F., Saviano, A., Cristiano, C., Casillo, G. M., Di Lorenzo, R., Sacchi, A., Laneri, S., Dini, I., De Vita, S., Chini, M. G., Bifulco, G., Calignano, A., Maione, F., Mascolo, N. (2020). Pharmacological and molecular docking assessment of cryptotanshinone as natural-derived analgesic compound. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 126, 110042.
25. Devaraj, E., Roy, A., Royapuram Veeraragavan, G., Magesh, A., Varikalam Sleeba, A., Arivarasu, L., Marimuthu Parasuraman, B. (2020). β -Sitosterol attenuates carbon tetrachloride-induced oxidative stress and chronic liver injury in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393(6), 1067–1075.
26. Babu, S., Krishnan, M., Rajagopal, P., Periyasamy, V., Veeraraghavan, V., Govindan, R., Jayaraman, S. (2020). Beta-sitosterol attenuates insulin resistance in adipose tissue via IRS-1/Akt mediated insulin signaling in high fat diet and sucrose induced type-2 diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 873, 173004.
27. Afify, E. A., Alkreathy, H. M., Ali, A.S., Alfaihi, H.A., Khan, L.M. (2017). Characterization of the antinociceptive mechanisms of khat extract (*Catha edulis*) in mice. *Frontiers in Neurology*, 8, 69.
28. Wang, Y., Su, D. M., Wang, R.H., Liu, Y., Wang, H. (2005). Antinociceptive effects of choline against acute and inflammatory pain. *Neuroscience*, 132(1), 49–56.
29. Scapinello, J., Müller, L. G., Schindler, M., Anzollin, G. S., Siebel, A. M., Boligon, A. A., Niero, R., Saraiva, T., Maus, N. P., Betti, A. H., Oliveira, J. V., Magro, J. D., & de Oliveira, D. (2019). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl (Araceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 236, 21–30.
30. Jang, Y., Kim, M., Hwang, S. W. (2020). Molecular mechanisms underlying the actions of arachidonic acid-derived prostaglandins on peripheral nociception. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 30.
31. Das, N., Bhattacharya, A., Kumar Mandal, S., Debnath, U., Dinda, B., Mandal, S. C., Kumar Sinhamahapatra, P., Kumar, A., Dutta Choudhury, M., Maiti, S., & Palit, P. (2018). *Ichnocarpus frutescens* (L.) R. Br. root derived phyto-steroids defends inflammation and algesia by pulling down the pro-inflammatory and nociceptive pain mediators: An in-vitro and in-vivo appraisal. *Steroids*, 139, 18–27.
32. Nirmal, S. A., Pal, S. C., Mandal, S. C., Patil, A. N. (2012). Analgesic and anti-inflammatory activity of β -sitosterol isolated from *Nyctanthes arbortristis* leaves. *Inflammopharmacology*, 20(4), 219–224.
33. Tamaddonfard, E., Erfanparast, A., Abbas Farshid, A., Delkhosh-Kasmaie, F. (2017). Role of ventrolateral orbital cortex muscarinic and nicotinic receptors in modulation of capsaicin-induced orofacial pain-related behaviors in rats. *European Journal of Pharmacology*, 815, 399–404.
34. Zhao, X., Ye, J., Sun, Q., Xiong, Y., Li, R., Jiang, Y. (2011). Antinociceptive effect of spirocycloperazine salt compound LXM-15 via activating peripheral $\alpha 7$ nAChR and M4 mAChR in mice. *Neuropharmacology*, 60(2–3), 446–452.

35. Pinheiro, M.M.G., Boylan, F., Fernandes, P.D. (2012). Antinociceptive effect of the *Orbignya speciosa* Mart. (Babassu) leaves: Evidence for the involvement of apigenin. *Life Sciences*, 91(9–10), 293–300.
36. Guginski, G., Luiz, A.P., Silva, M.D., Massaro, M., Martins, D.F., Chaves, J., Mattos, R.W., Silveira, D., Ferreira, V.M.M. Calixto, J. B., Santos, A.R. (2009). Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 93(1), 10–16.
37. Li, W., Cai, J., Wang, B.H., Huang, L., Fan, J., Wang, Y. (2018). Antinociceptive effects of novel epibatidine analogs through activation of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors. *Science China Life Sciences*, 61(6), 688–695.
38. Atzori, M., Cuevas-Olguin, R., Esquivel-Rendon, E., Garcia-Oscos, F., Salgado-Delgado, R. C., Saderi, N., Miranda-Morales, M., Treviño, M., Pineda, J. C., Salgado, H. (2016). Locus ceruleus norepinephrine release: A central regulator of cns spatio-temporal activation? *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 8, 25.
39. Mwobobia, R.M., Kanui, T.I., Abelson, K.S.P. (2020). Investigation of noradrenergic receptor system in anti-nociception using formalin test in the naked mole rat (*Heterocephalus glaber*). *Heliyon*, 6(10), e05216.
40. Cortes-Altamirano, J. L., Olmos-Hernandez, A., Jaime, H.B., Carrillo-Mora, P., Bandala, C., Reyes-Long, S., Alfaro-Rodríguez, A. (2018). Review: 5-HT1, 5-HT2, 5-HT3 and 5-HT7 receptors and their role in the modulation of pain response in the central nervous system. *Current Neuropharmacology*, 16(2), 210–221.
41. Anversa, R.G., Sousa, F.S.S., Birmann, P.T., Lima, D.B., Lenardão, E.J., Bruning, C.A., Savegnago, L. (2018). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of 1,2-bis-(4-methoxyphenylselanyl) styrene in mice: involvement of the serotonergic system. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(7), 901–909.



IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF β -SITOSTEROL IN LEAF OF *CALOTROPIS GIGANTEA* AND *CALOTROPIS PROCERA* BY HPTLC

*HPTLC İLE CALOTROPIS GIGANTEA VE CALOTROPIS PROCERA YAPRAĞINDAKİ β -
SİTOSTEROLÜN TANIMLANMASI VE MİKTAR TAYİNİ*

Shripad BAIRAGI^{1*} , Prashant GHULE¹ , Ritu GILHOTRA² 

¹Suresh Gyan Vihar University, Gyan Vihar School of Pharmacy, 302017, Jaipur, Rajasthan, India

²Suresh Gyan Vihar University, Principal, School of Pharmacy, 302017, Jaipur, Rajasthan, India

ABSTRACT

Objective: *The distinguishing proof and measurement of biomarker β -sitosterol present in a leaf of Calotropis procera and Calotropis gigantea belonging to family Asclepidiaceae was carried by utilizing high performance thin-layer chromatographic (HPTLC) characterization method. In the present research work the Exterinsic Standard Method is used for quantitative assessment.*

Material and Method: *It assures the accuracy of quantitative investigation and particularly benefit for HPTLC analysis. Aluminum-maintained silica gel 60F254 HPTLC plates of 250 μ m thickness was used for chromatographic analysis. Toluene: Ethyl acetate: Glacial acetic acid acidic 8:2:0.20 (v/v/v) solvent system was used as mobile phase. Anisaldehyde sulphuric acid is used for derivatisation and was evaluated at 510 nm.*

Result and Discussion: *β -sitosterol quantification in foundations of plant was observed as 11.63 μ g and 10.23 μ g for Calotropis procera and Calotropis gigantea respectively. The appropriateness and particularity of the established techniques was demonstrated by qualitative and quantitative analysis. This established method for estimation of β -sitosterol in the leaf of Calotropis procera and Calotropis gigantea was proved to be responsive, particular and replicable.*

Keywords: *Calotropis procera, Calotropis gigantea, HPTLC, identification, quantification*

ÖZ

Amaç: *Asclepidiaceae familyasına ait Calotropis procerave Calotropis gigantean yaprağında bulunan biyomarker β -sitosterol'ün ayırt edici kanıtı ve ölçümü, yüksek performanslı ince tabaka kromatografik (HPTLC) karakterizasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu çalışmada, kantitatif değerlendirme için dış standart yöntemi kullanılmıştır.*

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Shripad Bairagi
e-mail / e-posta: ssanandss@gmail.com, **Phone / Tel.:** +919604593644

Gereç ve Yöntem: Yöntem, kantitatif araştırmanın doğruluğunu sağlamaktadır ve özellikle HPTLC analizi için uygundur. Kromatografik analiz için, 250 µm kalınlığında silika jel 60F254 kaplı alüminyum HPTLC plakları kullanıldı. Mobil faz olarak; toluen: etil asetat: glasiyal asetik asit 8: 2: 0.20 (v / v / v) çözücü sistemi kullanıldı. Türevlendirme için anisaldehit sülfürik asit kullanıldı ve 510 nm dalga boyunda değerlendirildi.

Sonuç ve Tartışma: Bitki yapısındaki β-sitosterol miktarının *Calotropis procera* ve *Calotropis gigantea* için sırasıyla 11,63 µg ve 10,23 µg olduğu görülmüştür. Kullanılan yöntemlerin uygunluğu ve seçiciliği, nitel ve nicel analizlerle gösterilmiştir. Belirlenen bu yöntemin; *Calotropis procera* ve *Calotropis gigantea* yaprağındaki β-sitosterol miktarı tayini için, hassas, seçici ve tekrar edilebilir olduğu kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Calotropis procera*, *Calotropis gigantea*, HPTLC, miktar tayini, teşhis

INTRODUCTION

Estimation of plant potency was done by analyzing active components which are seen in herbals from natural origin. Legitimately established and approved technique may be utilized in qualitative as well as quantitative determination of compounds [1, 2].

The plant *Calotropis gigantea* and *Calotropis Procera* commonly known as Giant Milkweed, Crown Flower and Rubber Bush, Apple of Sodom respectively belongs to family Asclepiadiaceae [3,4]. *Calotropis procera* is local to India and few Asian countries [5]. *Calotropis gigantea* occurs all through India from Punjab and Rajasthan in the north to Kanyakumari in the south, reaching out into West Bengal, Assam in the East [6].

The major contents present in the leavaes of *Calotropis Procera* are amyirin, urosolicacid, calotropin, amyirin acetate, calotropagenin, β-sitosterol and cardenolides. Bioactive compounds like taraxasterylacete, gigantincine, isorhamnetin-3-O-glucopyranoside, calotroposides and isorhamnetin-3-O-rutinoside were isolated from *Calotropis gigantea* alcoholic root extract showed different Central Nervous System properties like anxiolytic and sedative [7,8,9].

But above investigation not gives adequate knowledge to quantify the bioactive entities in the plant. [1] So, present research aimed to develop chromatographic method which can be effective in quantifying β-sitosterol present in powderd leaf of *Calotropis gigantea* and *Calotropis procera*[10, 11, 12].

MATERIAL AND METHOD

Chemicals

Toluene, Ethyl acetate, Glacial acetic acid, β-sitosterol and precoated Silica gel were purchased from Merck, All other reagents were analytical grade, purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Plant Collection and Authentication

The leaves of both the plant *Calotropis Procera* and *Calotropis gigantea* plant was collected from nearby locality of Sonai, Ahmednagar (MH) India, and identified by the Scientist J. Jayanthi Botanical Survey of India (BSI), Pune and a voucher specimen (No. SMB 01 and No. SMB 02) was kept in the department of BSI, Pune, India.

Preparation of Extract

The leaves of *Calotropis Procera* and *Calotropis gigantea* cleaned under running water and were allowed shade dried in typical geological condition and powdered them and stored in air tight container for further use. The extraction of coarse powder was done using soxhlet apparatus by successive extraction method with different solvent respect to polarity index, [11] Solvent like Petroleum ether (40-60°C), Chloroform, methanol. The marc was dried before employing the solvent of higher polarity. The obtained extracts were dried by rotary evaporator at 40- 50°C under vacuum. Practical yield of petroleum ether extract (40-60°C), chloroform extract and methanol extracts were found to be 3.82, 2.34, 7.04 % w/w respectively [11].

Preliminary Phytochemical Screening

The secondary metabolites like glycosides, alkaloids, tannins, saponins, flavonoids and volatile oils are responsible for pharmacological effects. The confirmation of presence or absence of these metabolites done by chemical tests listed in table no 2 [13,14].

HPTLC Fingerprint Profiles for Various Extracts

Thin Layer Chromatography

TLC studies were done using all the extracts for determination of phytochemicals existing in plant extracts. To conduct present research work previously coated silica gel G TLC plates were used. Activation of plate was done at 110 ° C for 30 minutes using hot air oven prior to the start of the experiment. Test extracts were applied 1mg/ml of all extracts in the form of bands with respective solvent by Linomat 5 applicator [15,16].

Development of Solvent System

To get accurate separation on plate different solvent systems were tested. We got maximum spot in methanol extract for both the plant extract. So, we took methanol extract for further experiment. Then a specific solvent system was chosen and the plates were run by a selected solvent system. After pilot level experiments it was ensured that the compounds obtained from methanol extract fraction were separated by using solvent system in a ratio of 8:2:0.2 of Toluene: Ethyl acetate: Glacial acetic acid. Anisaldehyde sulphuric acid reagent was used for derivatization of TLC plate after the development of solvent system. For detection of β - sitosterol in UV or fluorescence light, it was therefore converted to a perceptible form to determine chromatographic estimation.

Preparation of β - Sitosterol Standard Solutions

Composition of stock Solution (A) containing β - Sitosterol in the concentration of $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$

$1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ concentration of β - sitosterol in Stock solution (A) was developed using methanol. The contents were dissolved firstly in 5.0 ml methanol which was then sonicated and then volume was made using methanol.

Composition of stock Solution (B) containing β - Sitosterol in the concentration of $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$

0.1 ml of stock solution A was added in a volumetric flask of 10 ml. 5 ml of methanol was used to dissolve the ingredients present in the flask, which was then sonicated and finally was diluted using methanol. Hence, $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of β - sitosterol solution was prepared for further analysis.

Preparation of Sample Solution

Due to the free solubility of β -sitosterol in methanol it was used for the extraction process. Fresh dried leaf powder (500 mg) of *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea* were extracted with methanol. Sonication of the mixture was done and was kept overnight to extract. The obtained filtrate after filtration of mixture from Whatman (No. 41) filter paper was used in chromatographic analysis. For quantitative analysis sample solution of $10\mu\text{l}$ was compared with with standard solution.

High Performance Thin Layer Chromatography

Linomat IV applicator was used to apply the standard quantities of both the extract to previously coated plates. For HPTLC estimation standardized mobile phase of TLC was used.

Chromatographic Conditions

For effective resolution using standardized solvent system the chromatographic conditions given in table 1 were used.

Preparation of Chromatogram

The quantitative analysis was carried according to the Standard Method by application of inconsistent strength of $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of standard β -sitosterol and the similar strength of $50\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of sample solution was applied to HPTLC plate.

Standard curve of β -sitosterol

To get an effective linearity result, reference standard β -sitosterol solution were applied in triplicate manner to a HPTLC plate at six dissimilar concentrations 5, 10, 15, 20, 25 and $30\mu\text{l}$ containing 1, 2, 3, 4, 5 and $6\mu\text{g}$ respectively. The resulted plate was then developed, spots derivatization, and detector response for the different strength was measured. The experiment was done in triplicate and mean values were calculated.

Table 1. Chromatographic condition for identification and quantification.

PARAMETERS	DESCRIPTION
STATIONARY PHASE	HPTLC precoated, silica gel G 60 F254 (Merck, Germany)
MOBILE PHASE	8:2:0.2 ration of Toluene: Ethyl acetate: Glacial acetic acid
SIZE	10 x 10 cm
DEVELOPING CHAMBER	Twin trough glass chamber 20 × 10 cm
MODE OF APPLICATION	Band
BAND SIZE	8 mm
SEPARATION TECHNIQUE	Ascending
TEMPERATURE	60 °C
SATURATION TIME	5 min
SCANNING WAVELENGTH	510 nm
SCANNING MODE	Absorbance

RESULT AND DISCUSSION

The quantitative assessment of β -sitosterol was conducted in the both extract using HPTLC (Figure 1). β -sitosterol is one of the common phytoconstituent therefore it is well represented in chromatogram. (Figure 1). In order to get best estimation various solvent system were used to optimize the method. From various solvent systems 8:2:0.2 ration of Toluene: Ethyl acetate: Glacial acetic acid resulted in best separation of β -sitosterol. As the β -sitosterol is not easily traceable in UV light so it transforms into the detectable substance. Derivatization was performed by immersing the TLC plate into Anisaldehyde sulphuric acid reagent for three seconds and air dried. The plates were scanned at 510 nm. The chromatographic conditions depicted in Table no. 1. The R_f value (0.41) for β -sitosterol in standard (Figure 2) and sample extract (Figure 3 & 4) was found. The simple, specific and accurate HPTLC method for analysis of β -sitosterol in both the plant extract has been created.

Preliminary phytochemical screening showed the presence of different phytochemical from the leaf extract of *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea* (Table 2).

Peak area graph and β -sitosterol concentration in root extract of *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea* when plotted showed the linear relationship. From graph in figure 5 equation of linear regression was obtained. From the regression equation of the linear regression graph, the quantity of standard β -sitosterol applied on plate is calculated (Table 3). Similarly, the amount of β -sitosterol per 10.0 μ l leaf extract sample was calculated and the results are given in the Table 4. The concentration of β -sitosterol in leaf of the plant *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea* are found to be 11.63 μ g and 10.23 μ g respectively. The employed method showed good peak shape of β -sitosterol. There was no impedance from different constituents from the extract.

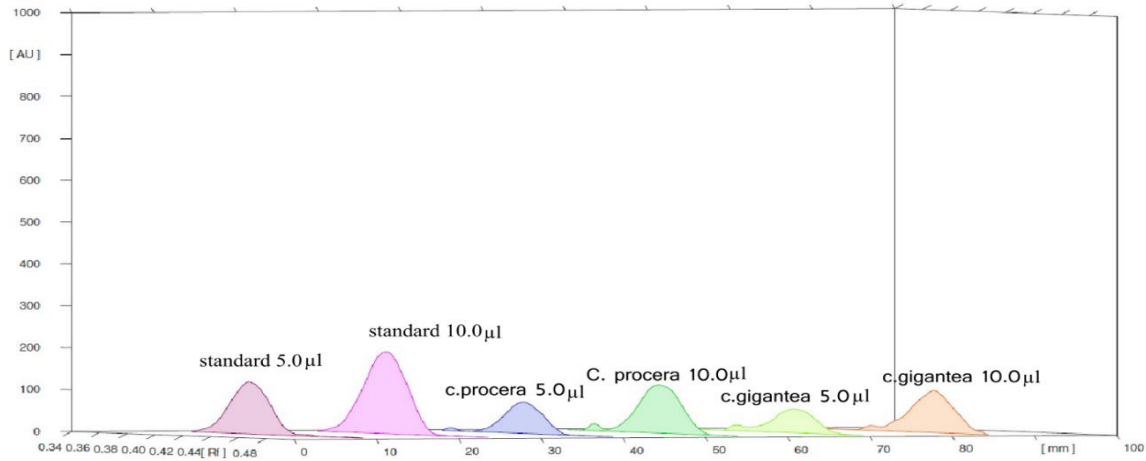


Figure 1. Destinograms of β – sitosterol and leaf extract of *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea*

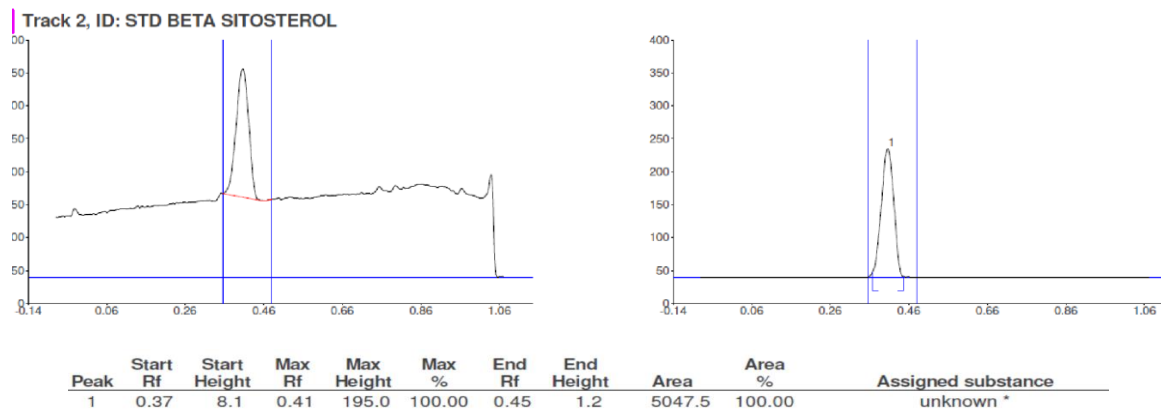


Figure 2. Chromatogram of standard β – sitosterol

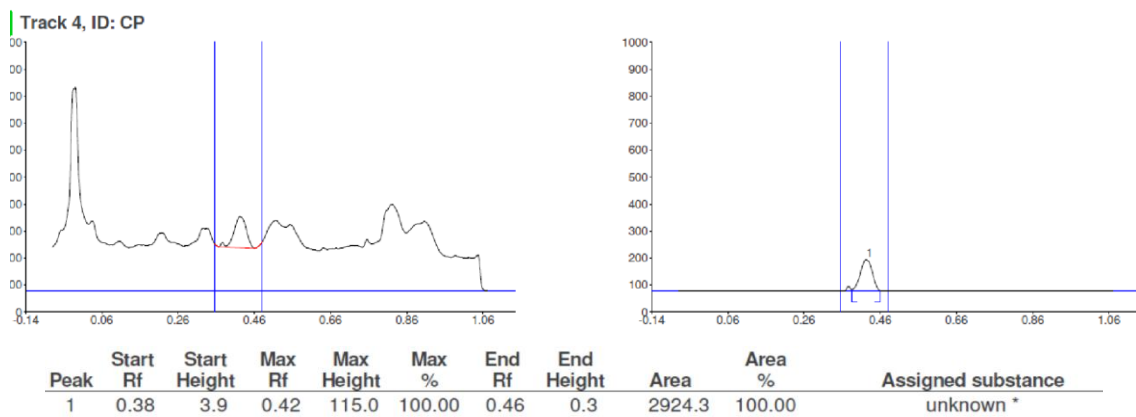


Figure 3. Chromatogram of leaf extract of *Calotropis procera*

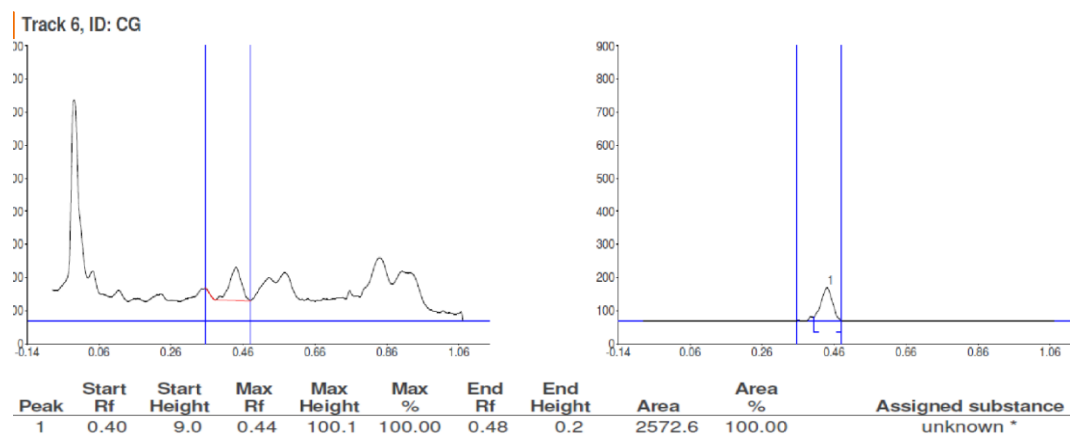


Figure 4. Chromatogram of leaf extract of *Calotropis gigantea*

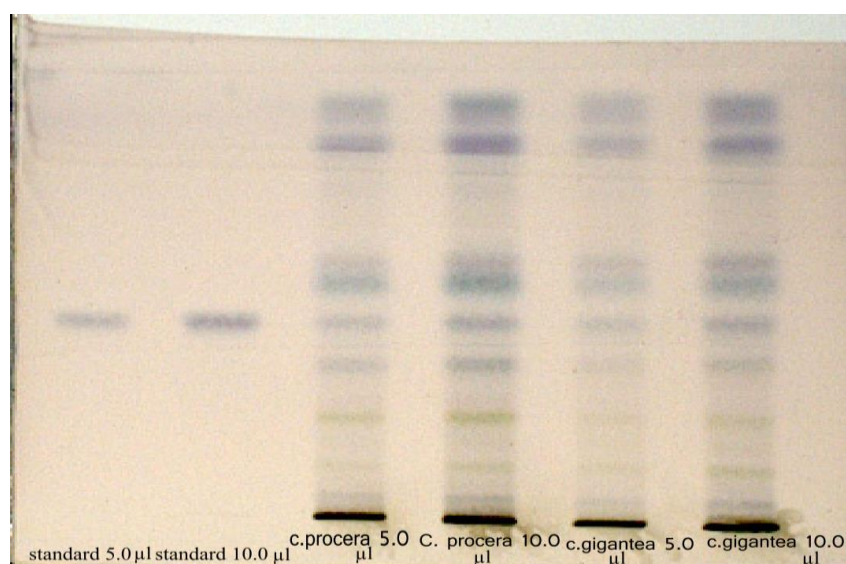


Figure 5. Quantification data of β -sitosterol in leaf extract of *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea* by HPTLC

Though there are magnificent developments in advance medicines, traditional medicines have always been proficient for dealing with several complications. Traditional medicines are an important resource in health care across the country [17]. Herbals are usually obtained from the mixture and its potency depends on the presence of the phytoconstituents [18]. Accuracy in quantitative and qualitative estimation is an important and essential necessity to make sure reproducible quality of natural source medicines. Assessment of phytochemicals shows the quality measurement, including preliminary testing to detection of active compound analysis, using modern analytical methods. HPTLC has proven effective method for the estimation of phytochemicals from natural origin [19].

The present study was aimed to quantify β -sitosterol from the extracts of *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea*. Research has shown that *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea* executed various medicinal properties [6]. In present research quantitative estimation of β -sitosterol was conducted using HPTLC. The R_f value (0.41) of β -sitosterol in standard and both the extract was found comparable at 510 nm under the UV light. HPTLC study was carried out to confirm the presence of β -sitosterol (R_f value 0.41) using 8:2:0.2 ratio of Toluene: Ethyl acetate: Glacial acetic acid as a solvent system. The selection of accurate mobile phase and sample preparation are the most crucial steps in analytical work, therefore in present study the development of the preparation of sample and selection of mobile phase were optimized. TLC and HPTLC techniques are the benchmark in the qualitative determination of the fractional amount of substances. This analytical method was established as easy, dependable and appropriate for qualitative estimation. From the present findings it confirms that the β -sitosterol can be reliably and conveniently estimated by HPTLC method for standardization purposes.

Table 2. Preliminary phytochemical screening of leaf extract of *C. procera* and *C. gigantea*

SR.NO.	PHYTOCHEMICAL CATEGORY	C. PROCERA	C.GIGANTEA
1	Carbohydrate	Present	absent
2	Alkaloids	Present	Present
3	Cardiac Glycosides	Present	Present
4	Anthraquinone glycosides	Present	Present
5	Terpenoids	Present	Present
6	Fats and Oils	Absent	Absent
7	Flavanoids	Present	Present
8	Saponin	Present	absent
9	Tannin and phenolic comp.	Present	Present
10	Steroids & Sterol	Present	Present
11	Protein and Amino acid	Absent	Present

Table 3. The R_f values and Peak Areas of standard compound- β -sitosterol and leaf extract of *C. procera* and *C. gigantea*

SR.NO.	APPLIED SAMPLE	APPLIED POSITION	APPLIED VOL	R_f VALUE	PEAK AREA
1	Standard β -sitosterol	12.0 mm	5.0 μ l	0.41	5047.5
2	Standard β -sitosterol	27.2 mm	10.0 μ l	0.41	10094
3	<i>Calotropis procera</i>	42.4 mm	5.0 μ l	0.42	2924.3
4	<i>Calotropis procera</i>	57.6 mm	10.0 μ l	0.42	5845.6
5	<i>Calotropis gigantea</i>	72.8 mm	5.0 μ l	0.44	2572.6
6	<i>Calotropis gigantea</i>	88.0 mm	10.0 μ l	0.44	5145.2

Table 4. The amount of β -sitosterol

SR.NO.	APPLIED SAMPLE	APPL. VOL.	RF	PEAK AREA	AMOUNT OF β -SITOSTEROL
1	<i>Calotropis procera</i>	5.0 μ l	0.42	2924.3	5.8 μ g
2	<i>Calotropis procera</i>	10.0 μ l	0.42	5845.6	11.63 μ g
3	<i>Calotropis gigantea</i>	5.0 μ l	0.44	2572.6	5.10 μ g
4	<i>Calotropis gigantea</i>	10.0 μ l	0.44	5145.2	10.23 μ g

HPTLC estimation was done for quantification of β -sitosterol from extract of leaf from *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea*. As a wide application of β -sitosterol in herbal medicines the HPTLC analysis technique ensures the specification and characteristics of medicinal plants. The method used by Niyati et al for quantification and identification of plant extract of β -sitosterol by HPTLC, accuracy of identification was less by using the Toluene:Methanol(9.4:0.6) solvent system, current research focuses on newly developed Toluene: Ethyl acetate: Glacial acetic acid(8:2:0.2) solvent system for HPTLC quantification and identification β -sitosterol with more accuracy and precision (Fig no. 1 & 5) [20]. This established method for estimation of β -sitosterol in the leaf of *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea* was proved to be responsive, particular and replicable.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception: S.B., P.G., R.G.; Design: S.B., P.G.; Supervision: S.B., P.G., R.G.; Resources: S.B., P.G.; Materials: S.B.; Data collection and/or processing: S.B.; Analysis and/or interpretation: S.B., P.G., R.G.; Literature search: S.B.; Writing manuscript: S.B.; Critical review: S.B., P.G., R.G.; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Aparna, S., Aruna, S. (2015). HPTLC Method for Identification and Quantification of β -sitosterol in the Roots of *Achyranthes aspera* Linn. *International Journal of Pharmaceutical Science*, 5(4), 1117-1122. <https://doi.org/10.7598/cst2015.1137>
2. Midmore, D.J. (2017). Principles of tropical horticulture. The Future of Tropical Horticulture, (pp. 353-418). Oxfordshire, UK. <https://doi.org/10.1079/9781780645414.035>
3. Khairnar, A.K., Bhamare, S.R., Bhamare, H.P. (2012). *Calotropis procera*: An ethnopharmacological update. *Advance Research in Pharmaceuticals and Biologicals*, 2(2), 142-156. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i11.21215>
4. Rahman, M., Wilcock, C. (1991). A taxonomic revision of *Calotropis* (Asclepiadaceae). *Nordic Journal of Botany*, 11(3), 301-308. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1756-1051.1991.tb01408.x>
5. Chatterjee, A., Chandra, P.S. (1995). *The Treatise of Indian Medicinal Plants: Volume: IV*. Nat Inst of Sc Communication, New Delhi, India.
6. Shripad, M.B., Prashant, G.J., Gilhotra, R. (2018). Pharmacology of Natural Products: A recent approach on *Calotropis gigantea* and *Calotropis procera*. *Ars Pharmaceutica*, 59(1), 37-44. <http://dx.doi.org/10.4321/S2340-98942018000100004>

7. Palejkar, C.J., Palejkar, J.H., Patel, M.A., Patel, A.J. (2012). A comprehensive review on plant *Calotropis gigantea*. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*, 2(2), 463-470.
8. Abhishek, D., Mohit, C., Ashish, G., Ameeta, A. (2010). Medicinal utility of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. as used by natives of village Sanwer of Indore District, Madhya Pradesh. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 1(3), 188-190. <http://dx.doi.org/10.18203/2319-2003.ijbcp20161484>
9. Al-Snafi, A.E. (2015). The constituents and pharmacological properties of *Calotropis procera*-an overview. *International Journal of Pharmacy Review and Research*, 5(3), 259-275.
10. Kitagawa, I., Zhang, R.S., Park, J.D., Baek, N.I., Takeda, Y., Yoshikawa, N., Shibuya, H. (1992). Indonesian plants, I. chemical structures of calotroposides A and B two new oxypregane-oligoglycosides from the root of *Calotropis gigantea* (Asclepiadaceae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 140, 2007-2013. <https://doi.org/10.1248/cpb.31.689>
11. Pari, K., Rao, P.J., Devakumar, C., Rstogi, J.N. (1998). A novel insect antifeedant nonprotein amino acid from *Calotropis gigantea*. *Journal of Natural Product*, 61, 102-104. doi: 10.1021/np970255z.
12. Sen, S., Sahu, N.P., Mahato, S.B. (1992). Flavonol glycosides from *Calotropis gigantea*. *Phytochemistry*, 31, 2919-2921. doi: 10.1016/0031-9422(92)83668-o.
13. Khandelwal, K. (2008). Practical Pharmacognosy, Techniques and Experiments, Nirali Prakashan, India, p.320.
14. Mukherjee, P.K. (2002). Quality Control of Herbal Drugs- An Approach to Evaluation of Botanicals, Business Horizons, p.800.
15. Shah, S.A., Ravishankara, M.N., Nirmal, A., Shishoo, C.J., Rathod, I.S., Suhagia, B.N. (2000). Estimation of individual sennosides in plant materials and marketed formulations by HPTLC method. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52, 445-449. <https://doi.org/10.1211/0022357001774066>
16. Stahl, E. (1969). Thin Layer Chromatography-A Laboratory Handbook, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p.1041. <https://www.springer.com/gp/book/9783642884900>
17. Shaikh, B.T., Hatcher, J. (2005). Complementary and alternative medicine in Pakistan: prospects and limitations. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(2), 139-142. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh088>
18. Kunle, O.F., Egharevba, H.O., Ahmedu, P.O. (2012). Standardization of herbal medicines-A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 4(3), 101-112. <https://doi.org/10.5897/IJBC11.163>
19. Chawla, R., Thakur, P., Chowdhry, A., Jaiswal, S., Sharma, A., Goel, R., Sharma, J., Priyadarshi, S.S., Kumar, V., Sharma, R.K., Arora, R. (2013). Evidence based herbal drug standardization approach in coping with challenges of holistic management of diabetes: a dreadful lifestyle disorder of 21st century. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 12(1), 35. <https://doi.org/10.1186/2251-6581-12-35>

20. Niyati, S.A., Sanjeev, R.A., Mamta, B.S., Dev, D.S. (2012). Development of pharmacognostical parameters and estimation of β -sitosterol using HPTLC in roots of *Gmelina arborea* Roxb. *Pharmacognosy Journal*, 30(4), 1-9.



TRİİYODOANİLİN'İN SENTEZLENMESİ, NANOSÜSPANSİYONLARININ HAZIRLANMASI, *İN VİTRO* KARAKTERİZASYONU VE RADYOKONTRAST ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

*SYNTHESIS OF TRIODOANILINE, PREPARATION OF NANOSUSPENSIONS, IN VITRO
CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF RADIOCONTRAST PROPERTIES*

Mehmet KOCA¹ , Emrah ÖZAKAR² , Rukiye SEVİNÇ ÖZAKAR^{2,*} 

¹ Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 25240, Erzurum,
Türkiye

² Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 25240, Erzurum,
Türkiye

ÖZ

Amaç: Suda çözünürlüğü bulunmayan iyot bazlı triiyodoanilin (TIA) radyokontrast bileşiğinin sentezini ve nanosüspansiyonunu yapmak, karakterizasyonlarını gerçekleştirmek ve Bilgisayarlı Tomografi (BT) görüntüleme sıklıkla kullanılan iopromid ve ioheksol ile kıyaslamak.

Gereç ve Yöntem: TIA sentezi ultrasonik ses dalgaları kullanılarak ve nanokristaller ise sentezlenen bu maddeden hareketle nanopresipitasyon yöntemi ile elde edilmiştir. TIA'nın karakterizasyonu için NMR ve Q-TOF analizleri yapılmıştır. Nanokristallerin karakterizasyonu için ise optik mikroskop, zeta potansiyel, partikül boyutu ve dağılımı, SEM ve FT-IR analizleri yapılmıştır. Elde edilen nanosüspansiyon, BT tekniği ile iopromid ve ioheksol ile radyokontrast özellikleri açısından kıyaslanmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Sentezlenen saf TIA'dan hareketle hazırlanan nanokristallerin boyutları ~699 nm, zeta potansiyelleri ise ~(-)16 mV olarak bulunmuştur. SEM ve optik mikroskop görüntüleri ile morfolojileri belirlenmiştir. Elde edilen nanokristallerin, sentezlenen TIA'dan farklı bir yapı sergilemediği FT-IR ile tespit edilmiştir. BT görüntülerinde TIA nanosüspansiyonunun, aynı miktardaki iopromid ve ioheksolden yaklaşık %40 daha fazla kontrast özellik sergilediği tespit edilmiştir. Sonuç olarak nanokristallerin kendi sahip oldukları eşsiz özellikleri ile daha az radyokontrast madde kullanılarak benzer nitelikte görüntüleme yapılabileceği gösterilmiştir. Bu sayede daha düşük dozda kullanım sunması sebebiyle daha az yan etki ve/veya toksik etki oluşturması muhtemeldir. Elde edilen bu başarılı sonuçlar ışığında, klinik deneyler ile bu çalışmanın gelecekte detaylandırılması planlanmaktadır.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Rukiye Sevinç Özakar
e-posta / e-mail: rukiyeso@atauni.edu.tr

Anahtar Kelimeler: BT görüntüleme, nanokristal, nanosüspansiyon, radyokontrast ajan, triiodoanilin

ABSTRACT

Objective: *Synthesis and nanosuspension preparation of iodine-based triiodoaniline (TIA) radiocontrast compound, which is not soluble in water, perform their characterization and compare with iopromide and iohexol, which are frequently used in Computed Tomography (CT) imaging.*

Material and Method: *TIA synthesis was obtained using ultrasonic sound waves, and nanocrystals were obtained by nanoprecipitation method from this synthesized substance. NMR and Q-TOF analyzes were performed for the characterization of TIA. For the characterization of nanocrystals, optical microscope, zeta potential, particle size, and distribution, SEM and FT-IR analyzes were performed. The obtained nanosuspension was compared by the CT technique with iopromide and iohexol in terms of radiocontrast properties.*

Result and Discussion: *The size of the prepared nanoparticles based on the synthesized pure TIA was found to be ~699 nm and zeta potentials as ~ (-)16 mW. Morphologies were determined by SEM and optical microscope images. It was determined by FT-IR that the obtained nanocrystals do not exhibit a different structure than the synthesized TIA. On CT images, TIA nanosuspension was found to exhibit ~ 40% more contrast than the same amount of iopromide and iohexol. As a result, it has been shown that nanocrystals can perform similar imaging by using less radiocontrast materials with their unique properties. In this way, it is likely to cause fewer side effects and/or toxic effects due to the lower dosage. In the light of these successful results, it is planned to detail this study with clinical trials in the future.*

Keywords: *CT imaging, nanocrystal, nanosuspension, radiocontrast agent, triiodoaniline*

GİRİŞ

Kontrast ajanlar, anatomi veya fizyopatolojideki farklılıklar temelinde, tanısal görüntülemelerde vücut dokuları arasındaki farklılıkları ortaya çıkarmaktadır. Bunu da yapıyı bitişik dokulardan daha görünür hale getirerek gerçekleştirirler. İyot bazlı kontrast ajanlar, bir hedef organ veya kan damarında x-ışını radyasyonunun daha fazla emilmesini ve saçılmasını sağlarlar [1].

İyot, molekül ağırlığının yüksek olmasından ötürü oldukça iyi bir kontrast ajan olup diagnostik amaçla kullanılan X-ışınlarını belirgin ölçüde absorbe etme yeteneğine sahiptir. İnorganik iyotlu bileşikler fazlasıyla iyonlaşma eğiliminde olduklarından organ görüntülemelerde kullanılamazlar. Ancak organik yapıdaki iyotlu bileşikler klinikte, özellikle de BT görüntüleme başta olmak üzere çeşitli tetkiklerde (koroner anjiyografi, beyin anjiyografi, periferik anjiyografi, intravenöz pyelografi ve voiding sistoürografi gibi) kontrast artırıcı kimyasallar olarak kullanılmaktadırlar [1, 2].

On yıllardır görüntülemelerde kullanılan ajanlar ile kontrast ajan odaklı tedaviler devam etmekle birlikte mevcut toksisite ve organ fonksiyon bozukluklarına sebep olmaları durumu üzerinde yeni tasarımlar pek fazla ön plana çıkmamıştır. Özellikle toksisite riskini ya da yan etki riskini azaltmaya yönelik yeni moleküllerin sentezi ve/veya bunların modifikasyonu üzerinde çalışmalar literatürde bir eksik olarak karşımıza çıkmaktadır [3]. Bu bağlamda, gelişen nanoteknoloji ile mevcut kontrast ajanlara alternatif olabilecek daha az miktar kimyasal ajan kullanılarak görüntülemenin gerçekleştirilebilmesi ve bu sayede daha az yan/toksik etki gözlenmesi muhtemeldir.

Nanosüspansiyonlar, suda ve yağda çözünme problemi yaşayan saf etkin madde partiküllerinin uygun bir polimer ve/veya yüzey aktif madde ile stabilize edilmiş, taşıyıcı bir sistem veya uygulama

aracı olmadan hazırlanan kristal yapıda, nano boyutlu, sıvı, mikron altı kolloidal dispersiyonlar olarak tanımlanır. Bu nanokristal yapılar, bir polimerik matriks (polimerik nanopartikül) veya bir lipidik matriksten (lipozom, nanoemülsiyon, lipid nanopartikül) oluşan matriks nanopartiküller ile karşılaştırıldığında, tamamen farklı bir farmasötik teknoloji ve üretim tekniğidir [4, 5]. Yüksek miktarda ilaç içermesi (% 100'e yakın) sayesinde, hücrelere giren ilacın yüksek oranda verimli bir şekilde taşınmasına, yeterince yüksek terapötik konsantrasyonların elde edilmesine ve farmakolojik etkilerin maksimum düzeye çıkarılmasına yardımcı olabilir. Günümüzde, ilaç taşınması için nanosüspansiyon teknolojisinin uygulanabilirliğini ve verimliliğini kanıtlayan çok sayıda araştırma mevcuttur [4, 6, 7]. Suda çözünmeyen çeşitli ilaçlarla ilgili bu çalışmalar, parenteral ve parenteral olmayan yollar da dâhil olmak üzere pek çok dozaj formunda ve uygulamasında etkinliklerini değerlendirmektedir. Örneğin çeşitli çalışmalarda genel ticari formülasyonlarla karşılaştırıldığında, nanosüspansiyonların suda çözünmeyen ilaçlar için artırılmış antitümör etkinliği ve azaltılmış toksisitesi ile kanser tedavisi için mükemmel bir ilaç taşıyıcı sistem olabileceği bildirilmiştir [7].

Serbest ilaç moleküllerine nazaran nanopartikül haldeki ilaçların Cmax, AUC ve böbrek farmakokinetiğini etkileyebilecek parametreleri, böbrek için etkili ilaçların geliştirilmesi için göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Nanopartiküllerden ilaç salımından sonra Cmax nadiren serbest ilacın intravenöz enjeksiyonu ile elde edilen seviyelere ulaşır. Bu kinetik, ilaca bağlı toksisiteyi azaltabileceğinden tedavi için büyük bir avantajdır. Yani nanopartiküllerin Cmax ile ilişkili toksisiteyi azaltabileceği anlamına gelmektedir [8]. Kaldı ki yığın materyalden hareketle nanometre boyutuna inildiği zaman partiküller inanılmaz farklı optiksel, elektriksel ve fizikokimyasal özellikler sergilemeye başlamaktadır [9].

Nanopartiküllerin kullanımı, geleneksel uygulama yöntemleriyle kullanıldığında (oral, i.v. gibi) toksisite oluşturan ilaçların yan etkilerinin azaltılmasını mümkün kılmaktadır. Ayrıca nanopartiküller, molekülleri vücutta bozulmaya karşı koruyabilir. İşlevsel bir nanopartikül tasarlanarak görüntüleme fonksiyonu oluşturulabilmektedir [10]. Moleküler görüntüleme de nano boyutlu kontrast ajanları geliştirmek için yararlı bir platformdur. Çoğu, dokuya nüfuz edecek kadar küçük olmakla birlikte standart radyolojik yöntemlerle tespit edilmek üzere tasarlanabilmektedirler [11]. Moleküler görüntüleme her zaman hedef bölgede kontrast madde birikimini gerektirir, bu genellikle kontrast madde içeren nanopartiküllerin hedeflendirilebilme özellikleriyle en verimli şekilde elde edilir. Düşük duyarlılığa sahip görüntüleme modaliteleri için, çoklu kontrast grupları taşıyan nanopartiküller sinyal amplifikasyonu sağlar. Ayrıca nanopartiküller hem kontrast ajanı hem de ilacı taşıyabilir ve böylece biyolojik dağılımın ve terapötik aktivitenin izlenmesine izin verir [12]. Bu nedenlerle nanotaşıyıcıların moleküler görüntülemede kullanımları artmaya başlamıştır.

İyodoanilin türevlerinin suda çözünürlüğü bulunmamakla birlikte [13, 14] özellikle TIA, yapısında barındırdığı iyot miktarı ile (~%81) görüntülemede kullanılma potansiyeli oldukça yüksek bir

radyokontrast özellik taşımaktadır [15]. Hali hazırda BT görüntülemeye kullanılan mevcut iyot bazlı radyokontrast ajanlar ile kıyaslandığında (ioheksol, iopromid gibi) molekül ağırlığına (MA) kıyasla yapısında barındırdığı bu yüksek miktar iyot sayesinde (Tablo 1), görüntüleme için toplamda daha az kimyasal ajan kullanılarak aynı görüntüleme sonuçları alınabileceği fikri ile bu çalışmanın temeli oluşturulmuştur.

Tablo 1. BT görüntülemeye kullanılan kontrast madde molekül ağırlıkları ve içeriklerindeki iyot miktarları (g/mol)

Kontrast Madde	MA	İyot
İopromid	791.10	380.712
İoheksol	821.14	380.712
TIA	470.82	380.712

Çalışmamızda sentezlediğimiz suda çözünürlüğü olmayan TIA'dan hareketle nanosüspansiyon formülasyonu oluşturulmuştur. Dolayısıyla hazırlanan bu yeni nanosüspansiyon ile vücuda daha az kimyasal girişi ile görüntülemenin yapılabilmesi, hipoksi ve vazokonstrüksiyon gibi yan etkilerin azalması ve/veya böbrekte daha az zarar oluşturması düşünülmektedir. Aynı zamanda literatür araştırmamızda iyot içeren ve taşıyıcı bir polimer kullanılmaksızın yapılmış bir nanosüspansiyon çalışmasına rastlanılmamıştır. Bu yönüyle de çalışmamız literatüre bir yenilik katmaktadır. Sentezlenen ve suda çözünürlüğü olmadığı halde iyot içeren, bir kontrast ajan olma potansiyeli taşıyan TIA'nın basit, hızlı, tekrar edilebilir, enerji gereksinimi az ve maliyeti düşük bir yöntem [16] olan nanopresipitasyon yöntemiyle nanosüspansiyon formülasyonu geliştirilmiş ve in vitro karakterizasyon teknikleri ile karakterize edilmiştir. Elde edilen nanosüspansiyon, BT görüntüleme yönteminde hali hazırda kullanılan ioheksol ve iopromid ile kontrast özellik bakımından kıyaslanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gereç

TIA sentezi için gerekli olan anilin, iyot ve hidrojen peroksit Sigma®'dan temin edilmiştir. Nanosüspansiyonun hazırlanmasında kullanılan Tween 60 ve PVA (MA: 130000, % 99 hidrolize), sırasıyla Merck®'den ve Sigma®'dan, dimetilsülfoksit (DMSO) ise Sigma®'dan temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik derecede saflığa sahiptir. Tüm analiz ve ölçümler Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Atatürk Üniversitesi DAYTAM ve Erzurum Teknik Üniversitesi YUTAM laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

TIA'nın (2,4,6-triiodoanilin) Sentezlenmesi

Anilin (2 mmol) ve moleküler iyot (4 mmol), distile su (10 mL) içerisinde oda sıcaklığında karıştırılmış, karışımın üzerine H₂O₂ % 30 (m/V) (8 mmol) ilave edilmiş ve elde edilen karışım oda

sıcaklığında 60 dakika ultrasonik banyoda tutulmuştur (Şekil 1). Reaksiyonun ilerleyişi ince tabaka kromatografisi ile uygun çözücü sistemi kullanılarak takip edilmiştir. Uygun süre sonunda sodyum tiyosülfatın doyurulmuş sulu çözeltisi (10 mL) balon içerisine dökülmüş ve 10 dakika süreyle oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Karışım, etil asetat (20 mL) ile 3 kez ekstrakte edilerek ayrılmıştır. Sonrasında organik faz, MgSO₄ ile kurutulup adi süzgeç kâğıdından süzölmüş ve organik çözücü evaporatör yardımıyla alçak basınç altında uzaklaştırılmıştır. Elde edilen ham katı madde, kolon kromatografisiyle saflaştırılmıştır [17].

TIA'nın NMR ve Q-TOF Analizi

Elde edilen TIA'nın saflığını belirlemek ve yapısını doğrulamak adına ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları ile kütle analizi gerçekleştirilmiştir. TIA'nın erime derecesi Elektrothermal 9100 erime derecesi aleti kullanılarak belirlenmiştir. Bileşiğin ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları solvent olarak dötero DMSO (d₆-DMSO) içerisinde, standart olarak tetrametilsilan kullanılarak Bruker FT-400 (100) MHz cihazı ile alınmıştır. Bileşiğin kütle analizi (Q-TOF) ise Agilent 6530 spektrometre cihazı ile yapılmıştır.

TIA Nanosüspansiyonunun Hazırlanması

Nanosüspansiyonun hazırlanmasında "Nanopresipitasyon" yöntemi kullanılmıştır [18]. Sentezlenen 100 mg saf TIA, 2.5 mL DMSO içerisinde çok noktalı manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözüldürülmüştür. Süre sonunda bu çözelti üzerine Tween 60 ilave edilmiştir. Bir süre karıştırıldıktan sonra elde edilen organik faz çok noktalı manyetik karıştırıcı üzerinde 1000 rpm hızda karışmakta olan 2.5 mL polivinil alkol (PVA, % 0.1, a/h) çözeltisi içerisine 5 dakika süreyle bir enjektör yardımıyla damlatılmıştır. Ultrasonik banyo içerisinde 1 dakika süreyle sonikasyona tabi tutulduktan sonra, homojen haldeki nanosüspansiyon 40 dakika süreyle 10000 rpm'de santrifüj edilmiş ve çöken nanokristaller saf su ilavesiyle yeniden süspande edilerek tekrar santrifüj edilmiştir. Bu işlem birkaç kez tekrarlanmış ve DMSO'nun uzaklaştırılması sağlanmıştır. Nanokristaller, bir gece -20 °C'de dondurulmuş ve devamında 24 saat süreyle liyofilize edilerek kuru toz halde elde edilmişlerdir. Kuru toz haldeki nanokristaller ileriki deneylerde kullanılmak üzere oda sıcaklığında bir desikatör içerisinde karanlıkta muhafaza edilmiştir.

Verim, Zeta Potansiyel, Partikül Boyutu ve Dağılımı Analizi

Verim, liyofilize TIA nanokristallerin miktarının, formülasyonu hazırlarken kullanılan toplam madde (etkin madde, stabilizan gibi) miktarına bölünmesi ile elde edilen sonucun % olarak ifade edilmesi şeklinde değerlendirilmiştir (n=3). Zeta potansiyel, polidispersite indeksi (PdI) ile partikül boyutu ve dağılımı ölçümlerini gerçekleştirmek üzere taze hazırlanmış nanosüspansiyon kullanılmıştır. Ölçümler 3 tekrar şeklinde "Malvern Zetasizer Nano ZSP" marka cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

100 µL nanosüspansiyon, 900 µL saf su ile seyreltilerek zeta hücrelerinin içinde oda sıcaklığında ölçülmüştür.

TIA Nanosüspansiyonunun Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

“Quanta FEG 250” marka SEM ile yığın haldeki saf TIA ve seyreltik halde liyofilize edilmiş TIA nanokristalleri morfolojik olarak incelenmiştir. Saf TIA ve nanokristaller doğrudan numune üzerinden ve yüksek çözünürlükle görüntülenmiştir.

TIA Nanosüspansiyonunun FT-IR Analizi

FT-IR analizleri, formülasyon bileşenleri ile etkin maddenin/maddelerin etkileşimlerini incelemek ve aralarında herhangi bir geçimsizlik olup olmadığını anlamak üzere yapılmaktadır. Saf TIA ile hazırlanan liyofilize nanokristallerin, 4000–400 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında, doğrudan toz numune üzerinden “Bruker VERTEX 70v” marka FT-IR spektrofotometresi ile spektrumları alınmıştır.

TIA Nanosüspansiyonunun BT Görüntüleme Analizi

BT tetkikleri, 256-kesitli BT cihazı (Somatom® Definition Flash, Siemens Healthcare, Forchheim, Germany) kullanılarak yapılmıştır. Görüntüler üzerine ROI (region of interest) konularak dansite değerleri bulunmuştur. Dansite değerleri üzerinden kontrast miktarları kıyaslanmıştır [19, 20]. Hali hazırda BT görüntülemeye kullanılan iopromid ve ioheksol, TIA nanokristalleri ile kıyaslanmıştır. Bu amaçla her bir etkin maddeden 20 mg tartılmış ve bir enjektör içerisinde 1 mL saf su ile çözündürülmüş/dispers edilmiştir. Bu sayede eşit miktar kimyasal madde kullanımı ile görüntüleme çalışmaları yapılmıştır. Eşit miktar kullanılan kimyasal maddelerin kontrast etkiyi oluşturan iyot miktarları ise Tablo 2’de verilmiştir.

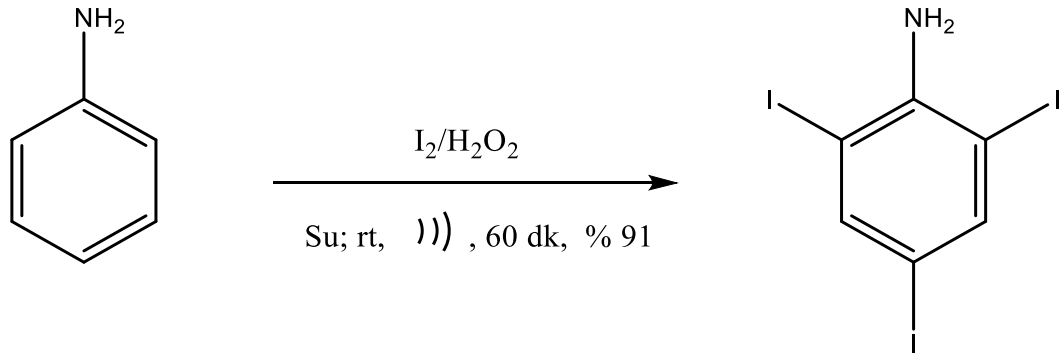
Tablo 2. BT görüntülemeye kullanılan eşit miktar kontrast maddelerin içerdikleri iyot miktarları (mg)

İopromid	İoheksol	TIA nanokristalleri
9.62	9.27	16.2

SONUÇ VE TARTIŞMA

TIA’nın (2,4,6-triiodoanilin) Sentezlenmesi

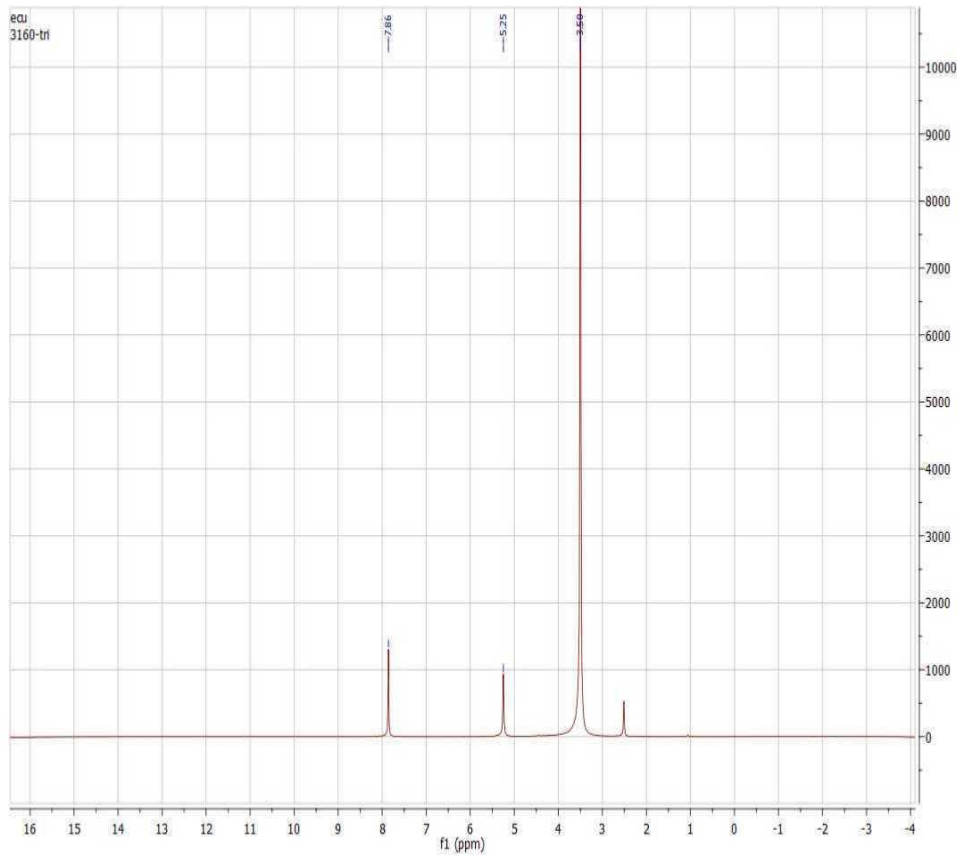
TIA, yüksek saflıkta ve verimde elde edilmiştir. Elde edilen ürüne ait sentez şeması Şekil 1’de verilmiştir [14].



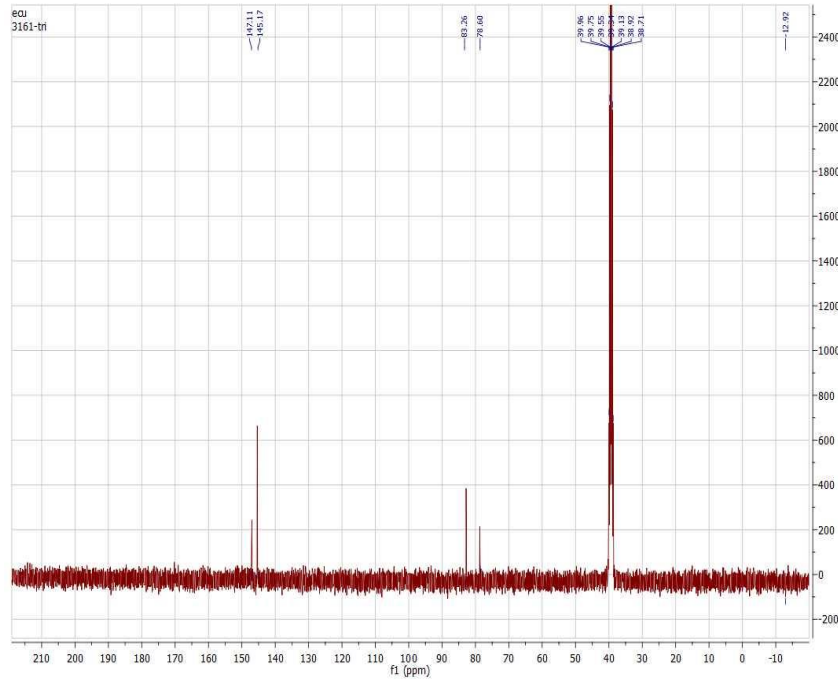
Şekil 1. 2,4,6-triiodoanilinin sentezi

TIA'nın NMR ve Q-TOF Analizi

TIA'ya ait 1H -NMR spektrumu Şekil 2'de, ^{13}C -NMR spektrumu Şekil 3'te ve Q-TOF analiz sonucu Şekil 4'te verilmiştir.

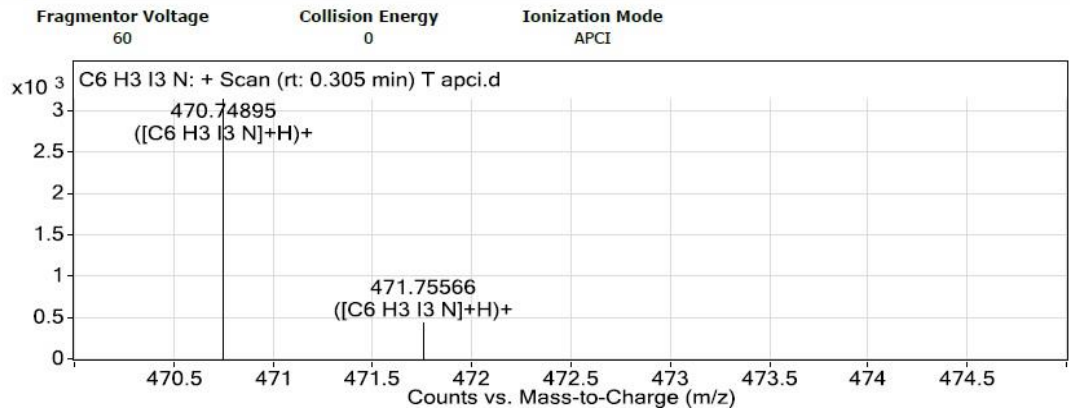


Şekil 2. Saf TIA'nın 1H -NMR Spektrumu



Şekil 3. Saf TIA'nın ^{13}C -NMR Spektrumu

User Spectra

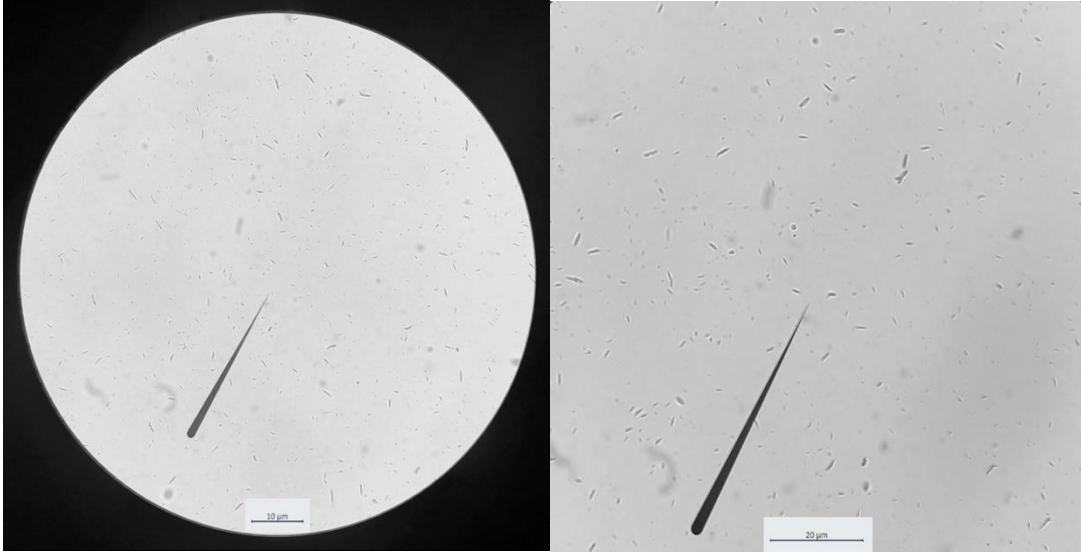


Şekil 4. Saf TIA'nın Q-TOF Spektrumu

TIA'nın verimi 91%, erime derecesi ise 183-185 °C olarak bulunmuştur. ^1H -NMR sonucu: (400 MHz, d_6 -DMSO) δ (ppm): 5.25 (s, 2H, NH_2), 7.86 (s, 2H, J:8.5 Ar-H). ^{13}C -NMR sonucu: (100 MHz, d_6 -DMSO) δ (ppm): 78.60 (CHAR-Ipara), 83.26 (2xCHAR-Iorto), 145.17 (2xCHAR), 147.11 (CHAR-NH2). Q-TOF sonucu: m/z 470.7478 (hesaplanan), 470.7489 (bulunan).

TIA Nanosüspansiyonlarının Hazırlanması

Nanopresipitasyon yöntemi ile % 92.35 verimle başarılı bir şekilde TIA nanokristalleri hazırlanmıştır. Taze hazırlanmış nanosüspansiyonlara ait optik görüntüler Şekil 5'te verilmiştir.



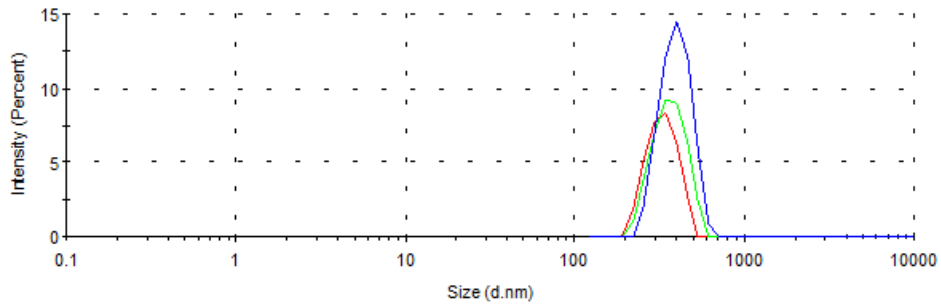
Şekil 5. TIA nanosüspansiyonuna ait optik görüntü (40x ve 100x)

Verim, Zeta Potansiyel, Partikül Boyutu ve Dağılımı Analizi

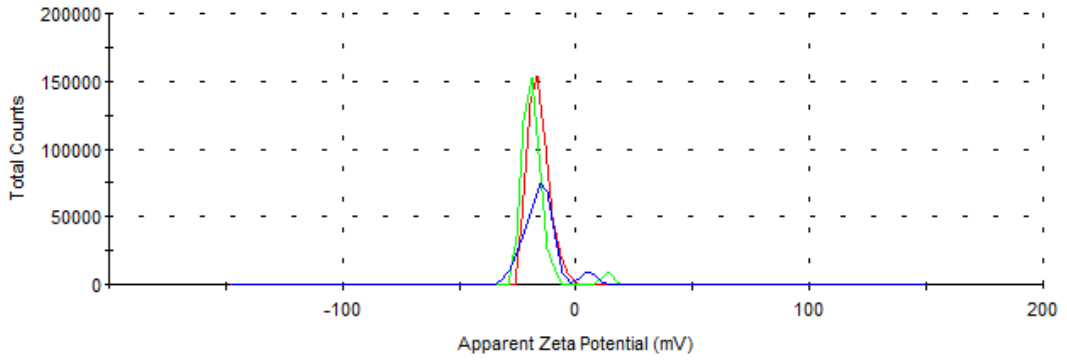
Taze hazırlanmış TIA nanosüspansiyonu verim, zeta potansiyel, polidispersite indeksi, partikül boyutu ve dağılım sonuçları ortalama ve standart sapma şeklinde Tablo 3'te verilmiştir. Zeta potansiyel ile partikül boyutu dağılım grafikleri ise Şekil 6 ve Şekil 7'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Verim, partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel sonuçları (n=3)

Verim (%)	Partikül Boyutu (nm)	PdI	Zeta Potansiyel (mV)
92.35±3.36	699.6±48.19	0.650±0.23	-16.23±1.46



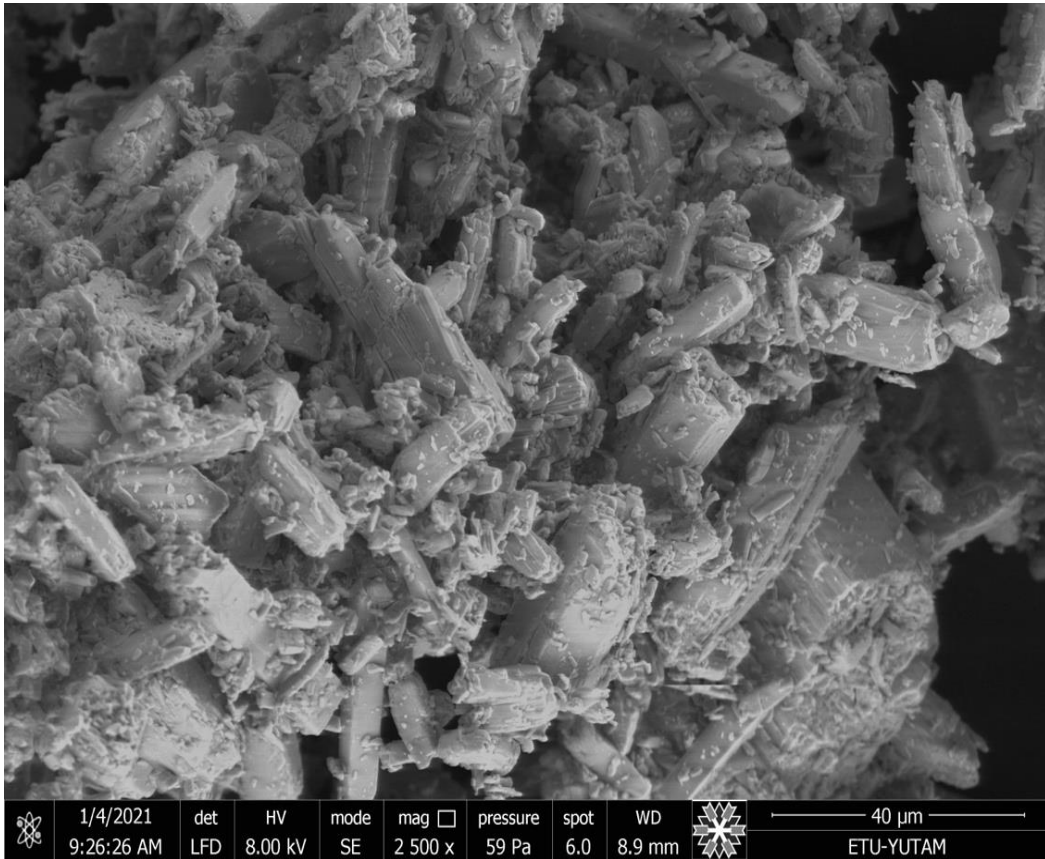
Şekil 6. TIA nanosüspansiyonu partikül boyutu dağılım grafiği (n=3)



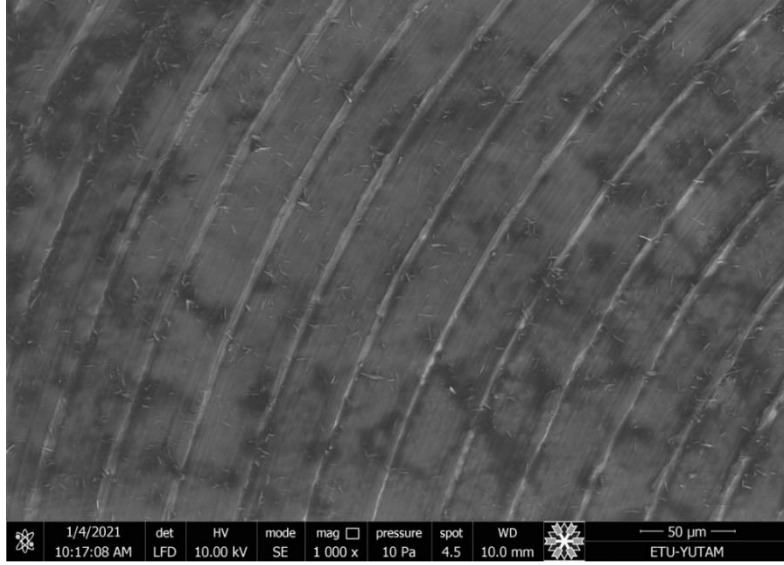
Şekil 7. TIA nanosüspansiyonu zeta potansiyel dağılım grafiği (n=3)

TIA Nanosüspansiyonun Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

Saf TIA'nın ve liyofilize TIA nanosüspansiyonlarını oluşturan nanokristallerin SEM görüntüleri Şekil 8 ve 9'da verilmiştir. Görüntülere bakıldığında yığın materyalden hareketle hazırlanan nanokristallerin homojen bir dağılım sergilediği ve çubuk yapısında olduğu görülmektedir.



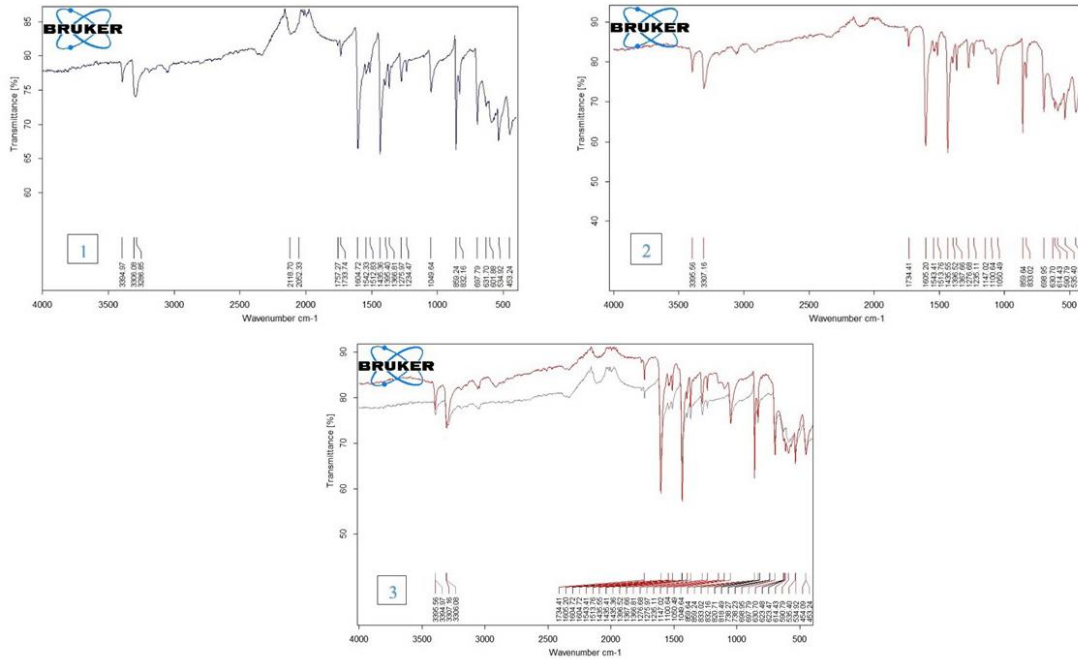
Şekil 8. Saf TIA'ya ait SEM görüntüsü



Şekil 9. TIA nanokristallerine ait SEM görüntüsü

TIA Nanosüspansiyonun FT-IR Analizi

Elde edilen spektrumlar Şekil 10’da gösterilmiştir. 1 numaralı spektrum saf TIA bileşiğine aitken 2 numaralı spektrum TIA nanokristallerine aittir. 3 numaralı spektrumda ise her iki spektrumun çakıştırılması görülmektedir. Spektrumlar incelendiğinde, ana yapının bütünlüğünü koruduğu ve nano boyuta indirgenen TIA’nın herhangi bir yardımcı madde ile etkileşime girmediği ve/veya hazırlama aşamasındaki işlemler neticesinde karakteristik kimyasal bağlarında herhangi bir değişikliğin olmadığı tespit edilmiştir.



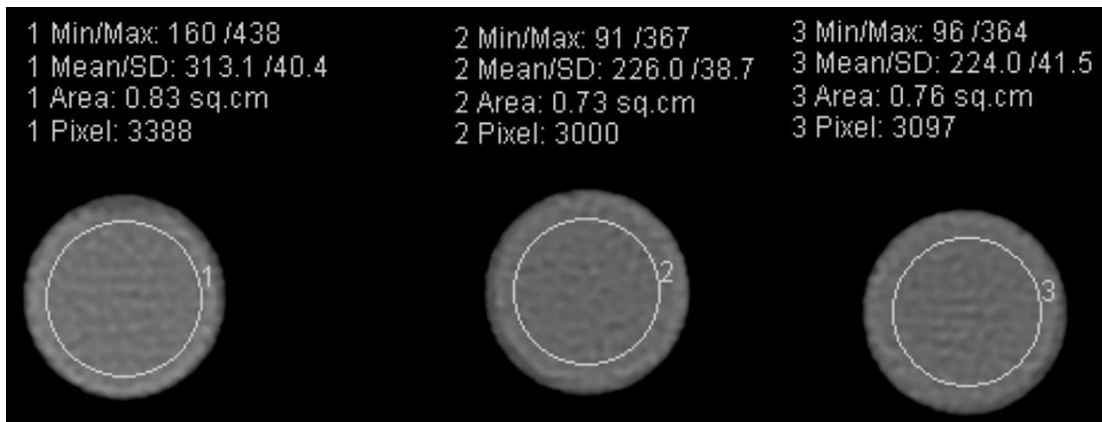
Şekil 10. Saf TIA (siyah) ve TIA nanokristallerine (kırmızı) ait spektrumlar

TIA Nanosüspansiyonun BT Görüntüleri

Örneklerin BT görüntüleme öncesi görüntüsü Şekil 11’de, elde edilen BT görüntüleri ise Şekil 12’de verilmiştir. Görüntülerdeki kontrast özellik yapıda var olan iyot miktarına bağlı olarak dansite üzerinden hesaplanmıştır. BT görüntüleme hazırlanan TIA nanosüspansiyonunun verdiği kontrast miktarı (313.1), referans kontrast ajanların (iopromid: 226, ioheksol: 224) kontrast miktarlarına kıyasla ~% 40 fazla (daha parlak) çıkmıştır. Sonuç olarak ~14.5 mg TIA nanosüspansiyonu ile 20 mg hali hazırdaki yaygın olarak BT görüntüleme kullanılan iopromid ve ioheksol ile aynı kontrast görüntü başarılı bir şekilde elde edilebilir durumdadır. Burada özellikle suda çözünürlüğü olmayan bir bileşiğin referans kontrast ajanlara kıyasla daha düşük miktarda kullanımı ile bir kontrast özellik oluşturabiliyor olması, nano boyuta inmenin verdiği bir avantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durum, nano boyutun sunduğu eşsiz optiksel, elektriksel ve fiziko-kimyasal özelliklerin bir tezahürüdür [9].



Şekil 11. BT görüntüleme öncesi TIA nanosüspansiyonu (1), iopromid (2) ve ioheksol (3)



Şekil 12. TIA nanosüspansiyonunun (1), iopromidin (2) ve ioheksolün (3) BT görüntüleme sonuçları

Yeni sentezlenen ilaç moleküllerinin bir çoğu (yaklaşık % 60), suda çözünmeyen veya az çözünen bir yapı ile düzensiz absorpsiyon sergilerler. Bu nedenle yeni formülasyonları ve yeni ilaç taşıyıcı sistemleri gerektirirler. Bu durum Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'ndeki (Biopharmaceutical Classification System, BCS) Sınıf II ve Sınıf IV ilaçlar için geçerlidir. Mikronizasyon, nanonizasyon, kompleksleştirme (örn., siklodekstrinler ile), lipozomların hazırlanması, amorf katı dispersiyonlar, kosolvan kullanılarak çözünürleştirme, permeasyon artırıcıların kullanımı, yağlı çözeltiler, yüzey aktif madde dispersiyonları, tuz oluşumu, çöktürme teknikleri vb. kullanılarak bu tür ilaçların sistemik absorpsiyonu, dolayısıyla da biyoyararlanımı artırılmaktadır. Her bir tekniğin kendi içinde sınırlamaları bulunmaktadır. Nanosüspansiyonlar, çoğu ilaç için ilaç etkinliğini ve farmakoekonomiyi artıran, alternatif ve gelecek vaat eden evrensel bir formülasyon yaklaşımıdır. Bir nanosüspansiyon, ilaç nanokristallerinden, stabilizan ajanlardan ve bir sıvı dispersiyon ortamından oluşur. Nanosüspansiyon teknolojisinin en büyük avantajı, çoğu ilaca uygulanabilirliği ve basitliğidir. Nanosüspansiyon teknolojisi, sadece ilacın çözünürlüğünü değil aynı zamanda ilacın farmakokinetiğini de değiştirmekte ve böylece ilaç güvenliğini ve etkinliğini artırmaktadır. İlacın nano boyuta indirilmesi, aşağıdan yukarıya (bottom-up) veya yukarıdan aşağıya (top-down) yöntemler kullanılarak sağlanabilir. Aşağıdan yukarıya doğru teknolojiler daha çok çöktürme yöntemleridir. Yukarıdan aşağıya doğru teknolojiler ise kaba ilaç partiküllerinden başlanarak geliştirilir [21].

Mevcut kontrast ajanların akut böbrek hasarı oluşturma riski fazla olduğu için [22, 23] görüntülemelerde tercih edilmemekle birlikte daha yüksek maliyetli ve uzun süren tetkiklere yönelinmektedir [24]. Özellikle suda çözünen bileşiklerin vücut içerisinde oluşturdukları osmotik basınç ve çözünen moleküllerin hücrelerde ve/veya organlarda bırakacağı hasar oldukça risk taşımaktadır [25]. Ancak kontrast bileşiğin nanoteknoloji kullanılarak geliştirilen nanokristal formunun sunacağı avantajlar oldukça fazladır. Bunlardan en önemlisi de nanosüspansiyon içerisindeki nanokristallerin sulu ortamda çözünmemesidir. Dolayısı ile vücuda intravenöz yolla verildiğinde nano boyutlu suda çözünmeyen TIA kristalleri kanda osmotik basınç oluşturmayacaktır. Osmotik basınç çözeltilerin koligatif bir özelliğidir [26] ve çözünmeyen hiçbir maddenin izotoniye etkisi de bulunmamaktadır. Nanokristallerin kandaki osmolariteyi artırmamasından dolayı, görüntülemelerde yeni bir yaklaşım olarak kullanılabilirlikleri bulunmaktadır.

Geliştirilmiş biyomarkerler ile, farklı böbrek hastalıklarının ve klinik sendromların teşhis ve tedavisi için ihtiyaç duyulmaktadır ve nano boyutlu kontrast maddeler ile gelecekte çeşitli böbrek hastalıklarının tedavisi sağlanabilir [14].

Nanopartiküller, şimdilerde nanotıp olarak bilinen tıbbi uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Nanopartiküller ayrıca PET, MRI, fotoakustik ve floresans görüntüleme gibi çeşitli tıbbi görüntüleme yöntemleri için izleyici bir ajan veya kontrast madde olarak kullanılırlar. Nanopartiküllere olan bu ilginin birçok nedeni vardır. Genel olarak, nanopartiküller küçük moleküller

ile karşılaştırıldığında yüksek miktarda kontrast madde taşırlar. Bu biyomedikal ortamlarda nanopartiküllerin uygulanmasından elde edilen bilgiler, BT için kontrast maddelerinin geliştirilmesinde uygulanmaktadır. BT için kontrast madde içeren nanopartiküllerin birçok heyecan verici uygulaması vardır. Örneğin, nanopartiküllerin dolaşım yarı ömürlerinin 15 saat kadar sürdüğü, oysa iyot moleküllerin ise dolaşım yarı ömürlerinin sadece dakikalar olduğu bildirilmiştir. Nanopartiküller, in vivo olarak hücre takibine izin vermek için kullanılabilir. Hedeflenen BT kontrast maddelerinin nanopartikülleri dokulardaki proteinlere veya hücrelere ulaştırabilmektedir [27]. Ek olarak nanopartiküller, çok işlevli olabilir ve bu nedenle BT, MRI ve floresans gibi çoklu görüntüleme yöntemleri için kontrast sağlayabilir veya terapötik etkiler sağlayabilir. Son olarak nanopartiküller, geleneksel iyotlu kontrast maddelerin böbrek yetmezliği veya alerjik tepkiler nedeniyle kontrendike olduğu hastalarla uyumlu olabilir [28]. Nanopartiküller, uzun dolaşım süreleri ve hedeflenme yetenekleri sayesinde ilaçların taşıma verimliliğini arttırmakta ve serbest ilacın spesifik olmayan dağılım gibi yan etkilerini azaltmaktadırlar [29]. Literatürde, iyot bazlı kontrast ajanların nanoboyuta indirilerek yapıldığı görüntüleme çalışmaları giderek artmaktadır [28, 30, 31]. Günümüzde X ışınları ile görüntülemeye (özellikle kalp, damar, akciğer, kemik, dalak, karaciğer gibi) pek çok nanopartikül kontrast ajan kullanılarak çalışmalar yapılmaktadır [27]. Örneğin literatürde, böbreklerde lokalize olabilen nanopartikül yapıda kontrast ajan çalışmaları da mevcuttur [32].

Nanosüspansiyonlar, sadece suda çözünürlüğü olmayan ilaçların çözünürlüğünü ve/veya biyoyararlanımını artırmakla kalmaz, aynı zamanda da onları işlevsel hale getirebilir. Kılcal damarlarda herhangi bir blokaj olmaksızın suda çözünürlüğü olmayan ilaçların intravenöz uygulama olasılığını da mümkün kılar ve ilaçların farmakokinetiğini değiştirir, ilaç güvenliğini ve etkinliğini de artırır [33, 34]. Örneğin, ratlarda denenen itrakonazol intravenöz nanosüspansiyonunun, çözelti formuna göre mantar önleyici etkinliğini arttırdığını göstermiştir [35]. Paklitaksel nanosüspansiyonunun, ortalama tümör yükünü azaltmada üstünlüğü bildirilmiştir [36]. Klofazimin nanosüspansiyonunun klofazimin stabilitesini artırmasının yanı sıra, Mycobacterium avium ile enfekte dişi farelerde kullanılan klofazim lipozom formülasyonuna kıyasla daha yüksek bir etkililikte iyileşme sağlamıştır [37].

Hazırladığımız nanosüspansiyonda PVA iyi bir stabilizan olmasına karşılık yapıya eklediğimiz yardımcı sürfaktan (Tween 60) sayesinde boyutun küçültülmesi sağlanmış ve devamında sonikasyon işlemi ile homojen boyut dağılımı sağlanmıştır. Literatürde benzer çalışmalarda bu durum gösterilmiştir [38].

Nanosüspansiyonlarda fiziksel stabilite çok önemlidir. Yalnızca elektrostatik itme ile stabilize edilmiş fiziksel olarak kararlı bir nanosüspansiyon için, minimum olarak ± 30 mV'luk bir zeta potansiyeli gereklidir. Ancak hem elektrostatik hem de sterik stabilizasyon durumunda ise, ± 20 mV'luk bir zeta potansiyel yeterlidir [39]. Ama formülasyon bileşenlerine ve proseslerine göre bu durum değişkenlik gösterebilir [38, 40, 41]. Taze hazırlanmış TIA nanosüspansiyonunu oluşturan

nanokristallerin partikül boyutları ortalama 699.6 ± 48.19 nm ve zeta potansiyelleri ise yine ortalama (-16.23 ± 1.46) mV olarak bulunmuştur. TIA nanosüspansiyonu hazırlandıktan sonra iki hafta süreyle oda sıcaklığı şartlarında bekletilmiş ve sonrasında tekrar boyut ve zeta potansiyel ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümlerde boyutun ortalama 721.7 ± 21.78 nm, zeta potansiyelinin ise ortalama (-13.9 ± 1.21) olduğu tespit edilmiştir ($n=3$). Ayrıca taze hazırlanmış TIA nanosüspansiyonunun PDI değeri ise 0.650 ± 0.23 , iki hafta süreyle beklettiğimiz TIA nanosüspansiyonunun PDI değeri ise 0.552 ± 0.029 olarak bulunmuştur. PDI, partikül boyutu dağılımının genişliği ve nanosüspansiyonların uzun süreli stabilitesi hakkında bir gösterge verdiği için nanosüspansiyon teknolojisinde önemli bir parametredir. 0.1–0.25 arasındaki bir PDI değeri, dar bir boyut dağılımının olduğu anlamına gelirken, 0.5'ten büyük bir PDI değeri çok geniş bir boyut dağılımının olduğu anlamına gelir (42, 43). PDI sonuçlarımız incelendiğinde, değerlerimiz 0.5'in üzerinde çıkmıştır ve bu da dağılımın geniş olmasına yol açmaktadır.

Yapılan çalışmalarda özellikle ± 5 mV'un altında zeta potansiyeli değerine sahip nanopartiküllerin/nanosüspansiyonların agregat oluşturma potansiyelleri olduğu belirtilmiştir [44, 45]. Ayrıca formülasyonumuzda hem elektrostatik hem de sterik (elektrosterik) stabilizasyonu sağlayan PVA kullanılmıştır [46]. Abdelbary ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada, aripiprazol nanosüspansiyonları üzerinde farklı polimerik stabilizanların etkilerini incelemişlerdir ve yapılan çalışma sonucunda polimerik stabilizanların nanokristal yüzeyine adsorbe olduğu sırada stabilizanın yüksek yüzey konsantrasyonu ve hidrofilik zincirlerinin sulu fazda uzamasının kristal üzerindeki polimer tabakasının kalınlığını artırdığını ve bu durumun zeta potansiyel değerinde bir azalmaya neden olsa bile nanosüspansiyonların sterik engelleme ile stabilizasyonun sağlandığını ifade etmişlerdir. Hazırlanmış oldukları bütün nanosüspansiyonlarda zeta potansiyel değerleri (-3.44 ± 0.131) mV ile (-18.73 ± 3.35) mV arasında bulunmuştur [47]. Müller ve Jacobs yaptıkları bir çalışmada da sterik olarak stabilize edici katman yeterince kalın olduğunda, daha düşük zeta potansiyeli değerlerine rağmen nanosüspansiyonların stabilitesinin korunabileceği sonucuna varmışlardır [48]. Ali ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada hidrokortizon nanosüspansiyonlarını hazırlamış ve fiziksel stabiliteyi değerlendirebilmek amacıyla 3 hafta süreyle 25 °C'de bekletmişlerdir. Taze nanosüspansiyonların boyutları 500 nm iken bekletme sonrasında 187 nm'lik bir artışla 687 nm'ye ulaşmıştır. Taze nanosüspansiyonların zeta potansiyel değeri ise (-18) mV olarak bulunmuştur ve bu değerlere sahip nanosüspansiyonların stabil halde kaldıklarını belirtmişlerdir [42]. Bu bilgilerden yola çıkarak formülasyonumuz için kısa süreli olarak sıvı ortam içerisinde stabilizasyonu sağlayabildiğimizi söyleyebiliriz ancak uzun süre sıvı ortam içerisinde stabilizasyon sağlamak için ilave çalışmalar yapılması öngörülmektedir.

Nanokristaller kazandıkları farklı optiksel, elektriksel ve fizikokimyasal özellikleri sayesinde eşsiz bir kullanım alanı sunmaktadırlar. Özellikle suda çözünürlüğü olmayan etkin maddeler için

kullanışlı bir platformdur. Dolayısıyla hazırladığımız TIA içeren yeni nanosüspansiyon formülasyonunun hipoksi, vazokonstriksiyon etkilerinin az olması ve böbrekte daha az zarar oluşturması muhtemeldir. Bu çalışmada TIA'nın nanosüspansiyonu başarılı bir şekilde hazırlanmış ve radyokontrast özelliğinin hali hazırda var olan kontrast ajanlara göre daha iyi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca daha düşük doz bileşik kullanılarak elde edilen daha yüksek kontrast özellik neticesinde görüntüleme için vücuda alınan kimyasal miktarın azalması ile bu yan/toksik etki oluşumunun azalması muhtemeldir. Tüm bu in vitro başarılı sonuçların prelinik ve klinik deneyler ile desteklenmesi gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

BT görüntülerinin alınmasında desteğini esirgemeyen Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalından Doç. Dr. Recep SADE'ye teşekkürlerimizi sunarız.

YAZAR KATKILARI

Kavram: M.K., E.Ö., R.S.Ö.; Tasarım: M.K., E.Ö., R.S.Ö.; Denetim: M.K., E.Ö., R.S.Ö.; Kaynaklar: M.K., E.Ö., R.S.Ö.; Malzemeler: M.K., E.Ö., R.S.Ö.; Veri toplama ve/veya işleme: M.K., E.Ö., R.S.Ö.; Analiz ve/veya yorumlama: M.K., E.Ö., R.S.Ö.; Literatür taraması: M.K., E.Ö., R.S.Ö.; Makalenin yazılması: M.K., E.Ö., R.S.Ö.; Kritik inceleme: M.K., E.Ö., R.S.Ö.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Caschera, L., Lazzara, A., Piergallini, L., Ricci, D., Tuscano, B., Vanzulli, A. (2016). Contrast agents in diagnostic imaging: Present and future. *Pharmacological Research*, 110, 65-75. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.04.023>
2. Koc, M.M., Aslan, N., Kao, A.P., Barber, A.H. (2019). Evaluation of X-ray tomography contrast agents: A review of production, protocols, and biological applications. *Microscopy Research and Technique*, 82(6), 812-848. <https://doi.org/10.1002/jemt.23225>
3. Almen, T. (1985). Development of nonionic contrast-media. *Investigative Radiology*, 20(1), 2-9. <https://doi.org/10.1097/00004424-198501002-00003>.

4. Müller, R.H., Gohla, S., Keck, C.M. (2011). State of the art of nanocrystals – Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.01.007>
5. Wang, Y., Zheng, Y., Zhang, L., Wang, Q., Zhang, D. (2013). Stability of nanosuspensions in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 172, 1126-1141. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.08.006>
6. Gao, L., Liu, G., Ma, J., Wang, X., Zhou, L., Li, X. (2012). Drug nanocrystals: In vivo performances. *Journal of Controlled Release*, 160, 418-430. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.013>
7. Wang, L.L., Du, J., Zhou, Y.Q., Wang, Y.C. (2017). Safety of nanosuspensions in drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 13(2), 455-469. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.08.007>
8. Kamaly, N., He, J.C., Ausiello, D.A., Farokhzad, O.C. (2016). Nanomedicines for renal disease: current status and future applications. *Nature Reviews Nephrology*, 12(12), 738-753. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.156>
9. Khan, I., Saeed, K., Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908-931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
10. Williams, R.M., Jaimes, E.A., Heller, D.A. (2016). Nanomedicines for kidney diseases. *Kidney International*, 90(4), 740-745. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.03.041>
11. Thurman, J.M., Serkova, N.J. (2013). Nanosized contrast agents to noninvasively detect kidney inflammation by magnetic resonance imaging. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 20(6), 488-499. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2013.06.001>
12. Debbage, P., Jaschke, W. (2008). Molecular imaging with nanoparticles: Giant roles for dwarf actors. *Histochemistry and Cell Biology*, 130(5), 845-875. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0511-y>
13. Chemical Book Web site. (2017). Retrieved September 28, from https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_cb5125267.htm.
14. Chemical Book Web site. (2017). Retrieved September 29, from https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_cb5110557.htm.
15. ChemSpider Web site. (2020). Retrieved September 29, from <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.193223.html>.
16. Sahu, B.P., Das, M.K. (2014). Nanosuspension for enhancement of oral bioavailability of felodipine. *Applied Nanoscience*, 4(2), 189-197. <https://doi.org/10.1007/s13204-012-0188-3>
17. Ferreira, I.M., Casagrande, G.A., Pizzuti, L., Raminelli, C. (2014). Ultrasound-promoted rapid and efficient iodination of aromatic and heteroaromatic compounds in the presence of iodine and hydrogen peroxide in water. *Synthetic Communications*, 44(14), 2094-2102. <https://doi.org/10.1080/00397911.2013.879900>

18. Rao, J.P., Geckeler, K.E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36(7), 887-913. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001>
19. Pirimoglu, B., Sade, R., Sakat, M.S., Ogul, H., Levent, A., Kantarci, M. (2018). Low-dose noncontrast examination of the paranasal sinuses using volumetric computed tomography. *Journal of Computer Assisted Tomography*, 42(3), 482-486. <https://doi.org/10.1097/RCT.0000000000000699>
20. Pirimoglu, B., Sade, R., Sakat, M.S., Polat, G., Kantarci, M. (2019). Low-dose non-contrast examination of the temporal bone using volumetric 320-row computed tomography. *Acta Radiologica*, 60(7), 908-916. <https://doi.org/10.1177/0284185118802597>
21. Ravichandran, R. (2009). Nanoparticles in drug delivery: Potential green nanobiomedicine applications. *International Journal of Green Nanotechnology: Biomedicine*, 1(2), 108-130. <https://doi.org/10.1080/19430850903430427>
22. De Simone, B., Ansaloni, L., Sartelli, M., Gaiani, F., Leandro, G., De' Angelis, G.L., Di Mario, F., Coccolini, F., Catena, F. (2018). Is the risk of contrast-induced nephropathy a real contraindication to perform intravenous contrast enhanced Computed Tomography for non-traumatic acute abdomen in Emergency Surgery Department?. *Acta Biomedica*, 89(9-S), 158-<https://doi.org/172.10.23750/abm.v89i9-S.7891>.
23. Mohammed, N.M.A., Mahfouz, A., Achkar, K., Rafie, I.M., Hajar, R. (2013). Contrast-induced nephropathy. *Heart Views : The Official Journal of the Gulf Heart Association*, 14(3), 106-116. <https://doi.org/10.4103/1995-705X.125926>
24. Cosmai, L., Porta, C., Privitera, C., Gesualdo, L., Procopio, G., Gori, S., et al. (2020). Acute kidney injury from contrast-enhanced CT procedures in patients with cancer: White paper to highlight its clinical relevance and discuss applicable preventive strategies. *ESMO Open*, 5(2), 1-8. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2019-000618>.
25. Sovak, M., Ranganathan, R. (1980). Stability of nonionic water-soluble contrast media: implications for their design. *Investigative Radiology*, 15(6), S323-328. <https://doi.org/10.1097/00004424-198011001-00068>
26. The LibreTexts Web site. (2006). Retrieved January 05, 2021, from [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Map%3A_Chemistry_-_The_Central_Science_\(Brown_et_al.\)/13%3A_Properties_of_Solutions](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Map%3A_Chemistry_-_The_Central_Science_(Brown_et_al.)/13%3A_Properties_of_Solutions)
27. Cormode, D.P., Naha, P.C., Fayad, Z.A. (2014). Nanoparticle contrast agents for computed tomography: a focus on micelles. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 9(1), 37-52. <https://doi.org/10.1002/cmml.1551>
28. Ashton, J.R., West, J.L., Badea, C.T. (2015). In vivo small animal micro-CT using nanoparticle contrast agents. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 1-22. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00256>
29. Williams, R.M., Shah, J., Tian, H.S., Chen, X., Geissmann, F., Jaimes, E.A., Heller, D.A. (2018). Selective nanoparticle targeting of the renal tubules. *Hypertension*, 71(1), 87-94. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09843>
30. Han, X.J., Xu, K., Taratula, O., Farsad, K. (2019). Applications of nanoparticles in biomedical imaging. *Nanoscale*, 11(3), 799-819. <https://doi.org/10.3390/nano10091700>


31. Hainfeld, J.F., Ridwan, S.M., Stanishevskiy, Y., Smilowitz, N.R., Davis, J., Smilowitz, H.M. (2018). Small, long blood half-life iodine nanoparticle for vascular and tumor imaging. *Scientific Reports*, 8, 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31940-2>
32. Kim, J., Lee, N., Hyeon, T. (2017). Recent development of nanoparticles for molecular imaging. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 375(2107), 1-17. <https://doi.org/10.1098/rsta.2017.0022>
33. Patel, V.R., Agrawal, Y. (2011). Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(2), 81-87. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.82950>
34. Sutradhar, K.B., Khatun, S., Luna, I.P. (2013). Increasing possibilities of nanosuspension. *Journal of Nanotechnology*, 2013, 346581. <https://doi.org/10.1155/2013/346581>
35. Rabinow, B., Kipp, J., Papadopoulos, P., Wong, J., Glosson, J., Gass, J., Sun, C.S., Wielgos, T., White, R., Cook, C., Barker, K., Wood, K. (2007). Itraconazole IV nanosuspension enhances efficacy through altered pharmacokinetics in the rat. *International Journal of Pharmaceutics*, 339(1-2), 251-260. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.02.030>
36. Merisko-Liversidge, E., Liversidge, G.G., Cooper, E.R. (2003). Nanosizing: A formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(2), 113-120. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(02\)00251-8](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(02)00251-8)
37. Peters, K., Leitzke, S., Diederichs, J.E., Borner, K., Hahn, H., Müller, R.H., Ehlers, S. (2000). Preparation of a clofazimine nanosuspension for intravenous use and evaluation of its therapeutic efficacy in murine Mycobacterium avium infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(1), 77-83. <https://doi.org/10.1093/jac/45.1.77>
38. Kalvakuntla, S., Deshpande, M., Attari, Z., Kunnatur, K. (2016). Preparation and characterization of nanosuspension of aprepitant by H96 process. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 6(1), 83-90. <https://doi.org/10.15171/apb.2016.013>
39. Singare, D.S., Marella, S., Gowthamrajan, K., Kulkarni, G.T., Vooturi, R., Rao, P.S. (2010). Optimization of formulation and process variable of nanosuspension: An industrial perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 402(1-2), 213-220. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.09.041>
40. Singh, S., Singh, S.K., Chauhan, M.G., Kumar, B., Pandey, N.K., Kaur, B., Kumar, A., Mohanta, S., Gulati, M., Wadhwa, S., Yadav, A.K., Singh, P.K., Kumari, Y., Kaur, G., Khursheed, R., Clarisse, A. (2019). Quality by design-based optimization of formulation and process variables for controlling particle size and zeta potential of spray dried incinerated copper nanosuspension. *Recent Innovations in Chemical Engineering*, 12(3), 248-260. <https://doi.org/10.2174/2405520412666190627144845>
41. Karakucuk, A., Celebi, N. (2020). Investigation of formulation and process parameters of wet media milling to develop etodolac nanosuspensions. *Pharmaceutical Research*, 37(6), 111. <https://doi.org/10.1007/s11095-020-02815-x>
42. Ali, H.S., York, P., Blagden, N. (2009). Preparation of hydrocortisone nanosuspension through a bottom-up nanoprecipitation technique using microfluidic reactors. *International Journal of Pharmaceutics*, 375(1-2), 107-113. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.03.029>

43. Patravale, V.B., Date, A.A., Kulkarni, R.M. (2004). Nanosuspensions: A promising drug delivery strategy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56, 827-840. <https://doi.org/10.1211/0022357023691>
44. Moorthi, C., Krishnan, K., Manavalan, R., Kathiresan, K. (2012). Preparation and characterization of curcumin–piperine dual drug loaded nanoparticles. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(11), 841-848. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60241-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60241-X)
45. Afifi, S.A., Hassan, M.A., Abdelhameed, A.S., Elkhodairy, K.A. (2015). Nanosuspension: An emerging trend for bioavailability enhancement of etodolac. *International Journal of Polymer Science*, 2015, 938594. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/938594>
46. Wiśniewska, M., Ostolska, I., Szewczuk-Karpisz, K., Chibowski, S., Terpiłowski, K., Gun'ko, V.M., Zarko, V.I. (2015). Investigation of the polyvinyl alcohol stabilization mechanism and adsorption properties on the surface of ternary mixed nanooxide AST₅₀ (Al₂O₃–SiO₂–TiO₂). *Journal of Nanoparticle Research*, 17(12), 1-14. <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-014-2831-2>
47. Abdelbary, A.A., Li, X., El-Nabarawi, M., Ellassasy, A., Jasti, B. (2013). Effect of fixed aqueous layer thickness of polymeric stabilizers on zeta potential and stability of aripiprazole nanosuspensions. *Pharmaceutical Development and Technology*, 18(3), 730-735. <http://dx.doi.org/10.3109/10837450.2012.727001>.
48. Müller, R., Jacobs, C. (2002). Buparvaquone mucoadhesive nanosuspension: preparation, optimisation and long-term stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 237(1-2), 151-161. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173\(02\)00040-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00040-6).



IN SILICO DRUG EVALUATION AND DRUG RESEARCH OF BIOACTIVE MOLECULE METHYL 4-BROMO-2- FLUOROBENZOATE

*BİYOAKTİF MOLEKÜL METİL 4-BROMO-2-FLOROBENZOAT'IN İN SİLİKO İLAÇ
DEĞERLENDİRMESİ VE ARAŞTIRMASI*

Malayappan Maria JULIE¹ , Thirutanasambantam PRABU² , Fazilath Basha ASIF³ ,
Sambanthan MUTHU^{4,5*} 

¹Department of Physics, St. Joseph's College of Arts and Science, 607 001, Tamilnadu, India

²Department of Physics, A. V. C College (Autonomous), 609 305, Tamilnadu, India

³Department of Physics, Islamiah College (Autonomous), 635 752, Tamilnadu, India

⁴Department of Physics, Arignar Anna Govt. Arts College, 604 407, Tamil Nadu, India

⁵Department of Physics, Puratchi thalaivar Dr. M.G.R. Govt. Arts and Science College, 603 406,
Tamil Nadu, India

ABSTRACT

Objective: *The biochemical analysis plays an important role in pharmaceutical chemistry. Fungal infections are the most common infectious disease worldwide. The result of this research study can be very useful for the pharmacy and drug discovery process.*

Material and Method: *The experimental UV-Vis absorption is recorded with DMSO as solvent in SAIF IIT (Sophisticated Analytical Instrument Facility, Indian Institute of Technology, Chennai, India). Biologically active sites are reviewed by Gauss software via MEP. Toxic predictions are completed with the Preadme online tool. Protein-Ligand interaction was studied by Autodock tools 4.2.6.*

Result and Discussion: *Methyl 4-bromo-2-fluorobenzoate (MBF) molecule is structurally stable. Hydrogen binding sites of MBF molecule are found around carbonyl group. The HOMO/LUMO energy values are -6.509 eV and -4.305 eV, respectively. Stabilization energy (3.63 kcal/mol) was calculated as O4=C11 atoms. Toxicity parameters are calculated. Overall results shows stabilized MBF molecule is intoxic and suitable for drug nature of fungal diseases.*

Keywords: *DFT, drug likeness, molecular docking, NBO, toxicity*

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Sambanthan Muthu
e-mail / e-posta: mutgee@gmail.com, **Phone / Tel.:** +914182225313

ÖZ

Amaç: *Biyokimyasal analiz farmasötik kimyada önemli bir rol oynar. Mantar enfeksiyonları dünya çapında en yaygın bulaşıcı hastalıktır. Bu araştırma çalışmasının sonucu, eczacılık ve ilaç keşif süreci için çok faydalı olabilir.*

Gereç ve Yöntem: *DeneySEL UV-Vis absorpsiyonu çözücü olarak DMSO kullanılarak SAIF IIT'de (Gelişmiş Analitik Cihaz Tesisi, Hindistan Teknoloji Enstitüsü, Chennai, Hindistan) kaydedildi. Biyolojik olarak aktif bölgeler, Gauss yazılımı tarafından MEP aracılığıyla incelendi. Toksikite tahminlemesi Preadme çevrimiçi aracı ile tamamlandı. Protein-Ligand etkileşimi Autodock 4.2.6 programıyla incelendi.*

Sonuç ve Tartışma: *Metil 4-bromo-2-florobenzoat (MBF) molekülü yapısal olarak kararlıdır. MBF molekülünün hidrojen bağlanma yerleri karbonil grubu çevresinde bulunur. HOMO/LUMO enerji değerleri, sırasıyla -4,305 eV ve -6.509 eV'dir. Stabilizasyon enerjisi (3.63 kcal/mol) O4 = C11 atomları olarak hesaplandı. Toksikite parametreleri hesaplandı. MBF molekülü ile mantar proteini arasında iki hidrojen bağı oluştu. Genel sonuçlar, stabilize edilmiş MBF molekülünün zehirli olmadığını ve mantar hastalıkları için ilaç olarak uygun olduğunu göstermektedir.*

Anahtar Kelimeler: *DFT, ilaç benzerliği, moleküler yerleştirme, NBO, toksisite*

INTRODUCTION

Benzoates and their halogenated derivatives represent an interesting class of biologically active compounds [1-3]. The title molecule, methyl 4-bromo-2-fluorobenzoate (MBF) is a halogenated benzoate derivative. Halogenated benzoate derivatives have drawn much attention because of their medicinal activities, such as antimicrobial [4] and anticancer [5]. In addition, benzyloxy-benzaldehyde derivatives were tested against the HL-60 cell line for anticancer activity [6]. Due to wide range of pharmaceutical application benzoate derivative attracts the attention of researchers. Quantum chemical computations have been proved to cost effective tool for structural exploration of any biologically active compounds. The quantum chemical calculations of methyl 2,5-dichlorobenzoate has been proposed in the literature [7]. Bacterial degradation properties are reported earlier in the literature and plant fungal diseases are studied on related fluorobenzoate derivative [8, 9]. Sodium benzoate and benzoate derivatives were studied earlier on biological activity mainly, fungal activity [10, 11]. From a thorough literature survey, *In silico* structure stable properties, pharmaceutical evaluations and biological behaviour of methyl 4-bromo-2-fluorobenzoate have been not reported so far.

In this present work, we report on optimized structure properties, chemical bond with stabilization [12] energy of bioactive headline compound. Band gap energies from molecular orbitals were calculated [13]. Pharmaceutical investigations like Drug likeness, Toxic and ADME properties, and Biochemical properties have explored. The electronic absorption spectrum of MBF has also been estimated using TD-DFT process. Furthermore, biologically active sites are identified from the electrostatic potential of MBF molecule [14], frontier molecular properties were investigated using theoretical calculations. Antifungal activity of MBF was studied by molecular docking method.

MATERIAL AND METHOD

Experimental details

The pure sample of MBF [methyl 4-bromo-2-fluorobenzoate] was obtained from the Sigma-Aldrich company, India with 99% of purity. UV-visible absorption spectrum of the sample was recorded in the range from 200 to 700 nm using a Perkin Elmer Lambda 35 spectrophotometer with 1 nm resolution.

Computational details

All the calculations were carried out using the Gaussian'09 program package [15]. All Druglikeness and toxic prediction was completed by PreAdme [16]. Docked protein was downloaded from RSCB [17]. The computation of the atomic charges was done by Kollman and Gasteiger method after the polar hydrogen was attached. The active with the Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) being used to carry site of the protein was defined with 126 Å x 126 Å x 126 Å grid size, out the process [18]. The docking calculations were carried out using the AutoDock 4.2 program software [19]. Protein-ligand interaction was visualized with PyMol [20].

RESULT AND DISCUSSION

Stabilized geometry

Geometrical parameters explains bond properties [21], the optimized stable structure of headline compound is shown in Figure 1. Stabilized global minimum energy is -3133.0601 Hartree. The title molecule has three substituents, namely fluorine, bromine and methyl carboxylate (-CO₂CH₃) group, which are attached with benzene ring. In the present work, the bond length 1.910, 1.339, 1.355, 1.439, 1.206, 1.401, 1.404 Å of Br1-C10, F2-C6, O3-C11, O3-C12, O4-C11, C5-C6, C5-C7. The highest bond length is predicted between as Br1-C10 with the value of 1.910 Å. The torsion angles are 179.9° for (C6-C5-C11-O3), 0.0° for (C7-C5-C11-O3) and 179.9° for (C5-C11-O3-C12). This conjugative charge transfer enhances the bioactivity of the MBF molecule. All the optimized structural parameters of MBF compound is given in Table.1.

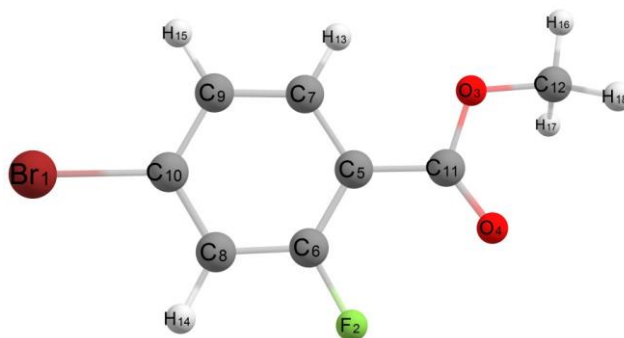


Figure 1. Stabilized geometrical structure of MBF molecule.

Table 1. Stabilized geometrical parameters of MBF compound.

Bond length	Value (Å)	Bond angle	Value (°)
	Calc.		Calc.
Br1-C10	1.910	C6-C5-C11	121.71
F2-C6	1.339	C7-C5-C11	121.33
O3-C11	1.355	C6-C5-C7	116.96
O3-C12	1.439	C5-C6-C8	122.40
O4-C11	1.206	C8-C10-C9	121.26
C5-C6	1.401	C7-C9-C10	118.79
C5-C7	1.404	C5-C11-O3	111.20
C6-C8	1.389	C11-O3-C12	115.63
C8-C10	1.389		
C10-C9	1.393	Torsional angle	
C9-C7	1.388	C6-C5-C11-O4	0.00
C7-H13	1.081	C6-C5-C11-O3	179.99
C9-H14	1.081	C5-C11-O3-C12	179.99
C8-H15	1.081	C6-C5-C7-C9	0.00
C12-H16	1.088	C5-C7-C9-C10	0.00
C12-H17	1.091	C10-C8-C6-C5	0.00
C12-H18	1.091		

Natural bond orbital analysis

The Donor-acceptor interactions are important parameter study the lone pair electrons of chemical or biochemical structures [22]. The predicted parameters of donor acceptor interactions theoretically are $\pi(\text{C-C})$, $\pi(\text{O-C})$ and $\pi^*(\text{C-C})$ orbitals as a function in this intramolecular charge transfer causes the stabilization in the molecular system and it is responsible for responsible for bioactivity. This interactions are identified from the overlap of the orbitals of $\pi(\text{O4-C11})$ to $\pi^*(\text{C5-C6})$, $\pi(\text{C5-C6})$ to $\pi^*(\text{C8-C10})$ and $\pi(\text{C8-C10})$ to $\pi^*(\text{C7-C9})$. The energy values of these interactions are shown in Table 2.

Table 2. Calculated stabilization energy between bonds by NBO method.

Donor-i		Acceptor-j		E(2) ^a kcal/mol	E(j)-E(i) ^b (a.u.)	F(i,j) ^c (a.u.)
Bonds	(Occupancy)	Bonds	(Occupancy)			
n1(O3)	1.96360	$\sigma^*(\text{C12-H16})$	0.00907	2.31	0.96	0.042
		$\sigma^*(\text{C12-H17})$	0.01329	4.60	0.72	0.054
		$\sigma^*(\text{C12-H18})$	0.01340	4.78	0.72	0.055
		$\sigma^*(\text{C7-H113})$	0.01156	2.78	2.07	0.070
n2(O4)	1.85367	$\sigma^*(\text{C5-C11})$	0.05584	14.95	0.72	0.094
$\pi(\text{O4=C11})$	1.98078	$\pi^*(\text{C5-C6})$	0.41107	3.63	0.39	0.037
$\pi(\text{C5-C6})$	1.63072	$\pi^*(\text{C7-C9})$	0.30312	21.18	0.30	0.072
		$\pi^*(\text{C8-C10})$	0.39699	19.25	0.28	0.066
$\pi(\text{C7-C9})$	1.66006	$\pi^*(\text{C5-C6})$	0.41107	19.03	0.27	0.065
		$\pi^*(\text{C8-C10})$	0.39699	22.79	0.26	0.070
$\pi(\text{C8-C10})$	1.68638	$\pi^*(\text{C5-C6})$	0.41107	20.42	0.29	0.070
		$\pi^*(\text{C7-C9})$	0.30312	17.22	0.30	0.064

^a E (2) hyperconjugative interactions energy.

^b Donor and acceptor differences (i)-(j) NBO orbitals.

^c F i,j Fock matrix element (i)-(j) NBO orbitals.

The lone pair interactions LP(1) carboxylate O3 to antibondings $\sigma^*(C7-H13)$ with stabilization energy 2.78 kcal/mol. This transfer of charge confirms the existence of C7-H13...O3 intramolecular hydrogen bonding.

Electronic properties

The FMO theory is important in defining the reactivity, bioactivity, and electronic properties of organic compounds. The HOMO energy represents to the being able to donate an electron [23, 24]. The HOMO-LUMO plots MBF is shown in Figure 2. The HOMO/LUMO energy values are -6.509eV along -4.305eV, respectively. The lowering energy gap authenticates the charge transfer within the MBF molecule. The bioactivity of MBF was verified by the discovery difference in energy value 2.204eV. The lower band gap energy of MBF compound is comparable with the bioactive materials. From the HOMO-LUMO energy values the global chemical reactivity descriptors such as electronegativity (χ), global hardness (η), global softness (S) and electrophilicity index (ω) of MBF are 0.1459, 0.1301, 0.5203 and -0.0818, respectively.

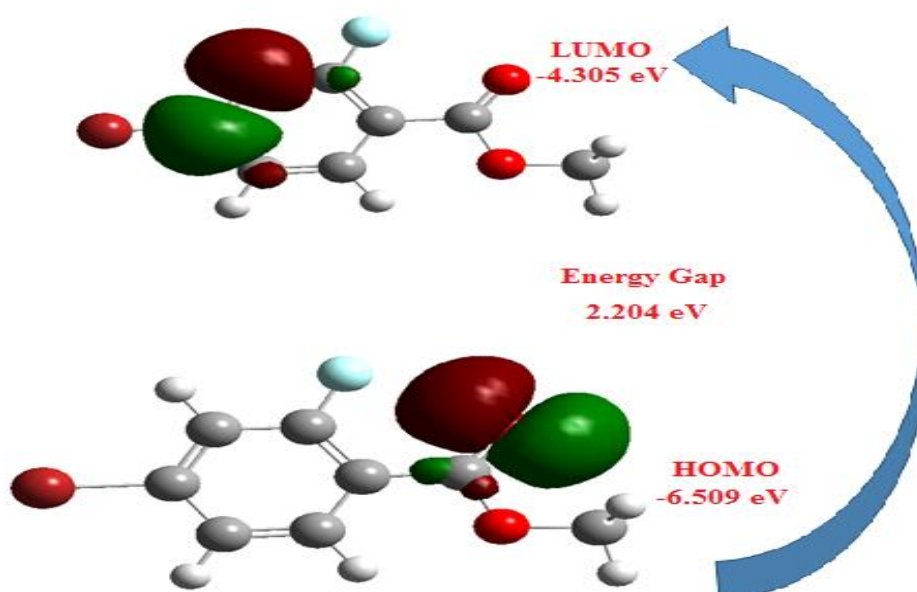
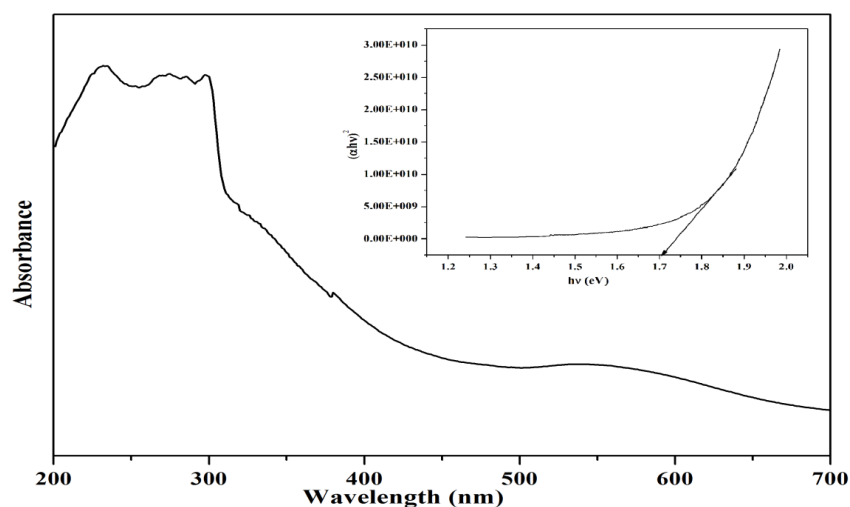


Figure 2. HOMO-LUMO orbitals of MBF molecule with bandgap energy.

The UV-Vis absorption spectrum recorded by using DMSO solvent and compared with the computed spectrum of MBF by same level theory. Predicted parameters like, excitation energies, absorption maxima are shown in Table 3. The compared UV-visible absorption spectrum of MBF compound is shown in Figure 3. The band gap value is 1.707eV calculated using Tauc's plot method [25], the measured UV-vis spectrum agrees well with the simulated HOMO-LUMO energy difference 2.204eV.

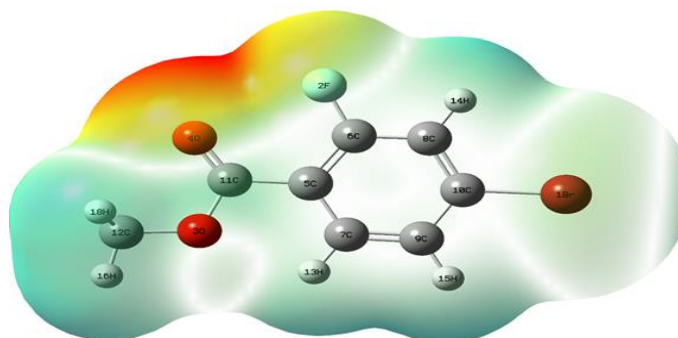
Table 3. Absorption wavelength and excitation energies of MBF molecule.

Wavelength(nm) inDMSO		Energy (eV)	Oscillator-strength (f)	Transition (assignments)
Theoretical	Experimental			
262	297	4.7362	0.1618	H-1->LUMO (36%), HOMO->LUMO (47%), HOMO->L+1 (12%) H-1->L+1 (3%)
256	271	4.8347	0.0001	H-2->LUMO (96%) H-2->L+6 (3%)
251	233	4.9313	0.3725	H-1->LUMO (42%), HOMO->LUMO (48%) HOMO->L+1 (8%)

**Figure 3.** UV-Vis spectrum of MBF molecule.

MEP analysis

MEP surface analysis provides information on a molecule's chemical reactivity and its uses allows limit to predict the electrophilic and nucleophilic attacks of any chemical compound [26, 27]. The MEP surface is shown in Figure 4 with electron density range of $-5.552e^{-2}$ (red) to $5.552e^{-2}$ (blue). The electrophilic sites are predicted on the surface of carbonyl group in MPF compound. Atom O4 in carbonyl is expected to have more bioactivity with the molecule due its electrophility.

**Figure 4.** MEP surface of MBF molecule.

ADME

Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion properties of a chemical structure are important parameters in pharmaceutical research [28]. Solute permeability (Blood Brain Barrier) value is 1.91742, while the buffer solubility is 11218. The Caco2 is 20.4652, CYP 2C19, CYP 2C9 are an inhibitor, HIA n value is 98.447181, MDCK is 0.277822, Plasma protein binding is 70.38, pure water solubility is 552.998, Skin permeability is -1.98533, SK logD value is 1.40496, and SKlogP value is 2.65296. The Plasma protein binding value is within the limit for the headline compound, which also has a reputed role in therapeutic uses and recommendations pharmacokinetics drug metabolism [29].

Drug likeness properties

In drug discovery process the drug likeness properties has effective role in the production of active drugs [30]. By comparing the values reported with parameters, HIA value between 70 and 100% shows good human intestinal absorption and for this molecule it is 96.91%. Caco-2 and MDCK cell permeability are two predicted parameters for oral absorption of drugs. The computed Caco-2 cell permeability value is 21.803 nm/s and MDCK cell permeability value is 0.5697 nm/s respectively. The inhibited P-glyco protein value for the molecule shows that the inhibitor and the protein were responsible for the pharmacokinetic properties of the drug. The analysis of pure water solubility is 2370.34 mg/L. The cytochrome protein indicates that the molecule is inhibitor of 2C19, 2C9 and 3A4 which reduces the capability of the drug and pharmacological effects of the drug [9]. In present the different types of rules are implemented to study violations of the headline compound. The Lead-like has suitable of its binding affinity is greater than 0.1microM and it has zero violations, MDDR like rule shows the nondrug-like nature, because of no rings, no rigid bonds, no rotatable bonds, while the important rule of five shown that hydrogen bond donors and hydrogen bond acceptors are less than five in headline molecule, molecular mass is less than 500, which shows that the Lipinski rule has no violations and this molecule is suitable for drug discovery procedure. Moreover the WDI like rule is out of 90% cutoff. Overall, the of MBF structure druglikeness properties shows as a suitable compound for drug discovery procedure.

Toxicity

Toxic prediction plays crucial role in drug discovery process and it is important parameters to identify the intoxic nature of various chemical compounds [31]. For the MPF compound algae at value is 0.051268, Ames test is as usual mutagen and the important carcino mouse is negative and the carcino rat is positive. The daphnia at value is 0.195, while the hERG is at low risk inhibition stage. The medaka at and minnow at values are 0.0526 and 0.028, respectively. All the above values are compared with the resultant parameters of reported literature. All the predicted toxic parameters values show the in toxic nature in the compound.

Ramachandran plot

Statistical distributions of amino acids in protein crystal structure can be studied from Ramachandra plot. In present study the Pass online bio activity predictor [32, 33] is used to find the inhibition activity of the MBF compound. The protein 4FPR is chosen study the PL interaction and it is subjected to find the quality of protein. Most of the amino acids are fall within the allowed region of 4FPR crystal structure. This shows the crystal structure of protein is stable in nature. The allowed regions of 4FPR protein residues are shown in Figure 5.

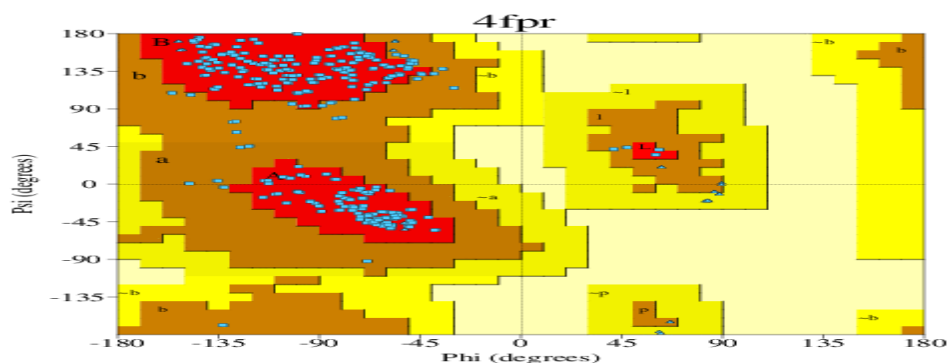


Figure 5. 2D Ramachandra plot for fungal protein structure (4FPR).

Molecular docking study

Molecular docking plays prominent role in drug design for treating of many diseases [34, 35]. In this process, we have explored the binding of a molecule with protein and thus effectively act as a drug and so docking has a great importance in the field of drug discovery. In present case, MBF compound is subjected to dock with the 4FPR fungal protein. Fungal disease is an infectious disease across the world. Piperazine derivative was investigated and reported for fungal activity with -4.73 kcal/mol binding with single hydrogen bond interaction [36]. The MBF ligand forms two hydrogen bonds the chosen protein structure. Hydrogen bond interacted image is shown in Figure 6.

The atom O4 forms the bonds with the distance of 2.0 Å and 1.8 Å with the residues SER'28, and GLU'130, respectively. The binding energy -5.00kcal/mol is recorded as highest binding energy in this PL interaction. Hence, this MBF compound is predicted as potential drug candidate for fungal disease and bioactivity of the headline compound is confirmed.

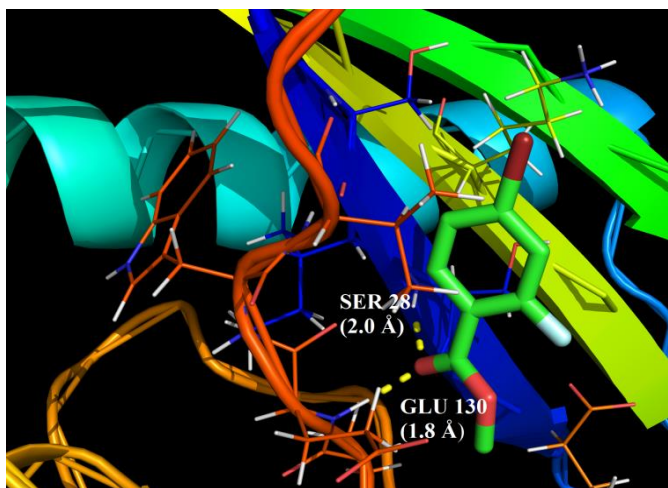


Figure 6. Hydrogen bond interacted image of MBF ligand with receptor fungal protein 4FPR.

In this study we investigated, structural properties (bond length between each atoms) of methyl 4-bromo-2-fluorobenzoate by optimizing the structure using DFT tools. The bioactive conformation revealed the existence of C-H \cdots O hydrogen bonding in between halo-benzene hydrogen and carboxylate oxygen, which confirmed through NBO study. Calculated band gap energy (1.707 eV) from absorption spectra is compared with the band gap energy of HOMO-LUMO and which comparable with biologically active molecules. Different parameters like Solute permeability (Blood Brain Barrier) value are 1.91742, while the buffer solubility is 11218 of MBF compound is calculated from ADME properties. In drug likeness predictions, the Lipinski rule of five has no violation and the all the rules are suitable on the headline compound for drug nature. Carcino mouse is negative, which shows intoxic nature of MPF compound. Molecular docking result corroborates this result with -5.00 kcal/mol binding energy. Hence the MPF compound and docked protein is structurally stable and form hydrogen bond between each other. So, we predict MPF compound might be a potential anti fungal drug candidate for fungal disease.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception: *M.M.J., F.B.A.*; Design: *M.M.J., F.B.A.*; Supervision: *T.P., S.M.*; Resources: *T.P., S.M.*; Materials: *T.P., S.M.*; Data collection and/or processing: *M.M.J., F.B.A.*; Analysis and/or interpretation: *M.M.J.*; Literature search: *M.M.J.*; Writing manuscript: *M.M.J., F.B.A.*; Critical review: *M.M.J., T.P.*; Other: *M.M.J., F.B.A.*

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Hudlicky, M., Pavalath, A.E. (1995). Chemistry of organic Fluorine Compounds II.A Critical Review, American Chemical Society, Washington, DC.
2. Banks, R.E., Smart, B.E., Tatlow, J.C. (1994). Organoflourine Chemistry: Principals and Applications, Plenum Press, New York.
3. Edwards, P.N. (1994). Uses of Flourine in Chemotherapyin Organoflouine Chemistry: Principles and Applications, Plenum Press, New York.
4. Ankersen, M., Peschke, B., Hansen, S.B., Hansen, T.K. (1997). Investigation of bioisosters of the growth hormone secretagogue L-692,429. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 7, 1293-1298. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(97\)00216-3](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(97)00216-3)
5. Revesz, L., Blum, E., Di Padova, F.E., Buhl, T., Feifel R., Gram, H., Hiestand, P., Manning, U., Rucklin, G. (2004). Novel p38 inhibitors with potent oral efficacy in several models of rheumatoid arthritis. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 14, 3595-3599. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.03.106>
6. Lin, F.C., Yang, J.S., Chang, C.Y., Kuo, C.S., Lee, R.M., Huang, J.L. (2005). Synthesis and anticancer activity of benzyloxybenzaldehyde derivatives against HL-60 cells. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 13, 1537-1544. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.12.026>
7. Xuanand, X., Zhai, C. (2011). Quantum chemical studies of FT-IR and Raman spectra of methyl 2, 5- dichlorobenzoate. *Spectrochimica Acta A*, 79, 1663-1668. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.05.032>
8. Oltmanns, R.H., Müller, R., Otto, M.K., Lingens, F. (1989). Evidence for a new pathway in the bacterial degradation of 4-fluorobenzoate. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(10), 2499–2504. <https://doi.org/10.1128/AEM.55.10.2499-2504.1989>
9. Schlömann, M., Schmidt, E., & Knackmuss, H. J. (1990). Different types of dienelactone hydrolase in 4-fluorobenzoate-utilizing bacteria. *Journal of Bacteriology*, 172(9), 5112–5118. <https://doi.org/10.1128/jb.172.9.5112-5118.1990>
10. Shimazaki, A., Sakamoto, J.J., Furuta, M., Tsuchido, T. (2016). Antifungal Activity of Diglycerin Ester of Fatty Acids against Yeasts and Its Comparison with Those of Sucrose Monopalmitate and Sodium Benzoate. *Biocontrol Science*, 21(2), 123–130. <https://doi.org/10.4265/bio.21.123>
11. Korošec, B., Sova, M., Turk, S., Kraševc, N., Novak, M., Lah, L., Stojan, J., Podobnik, B., Berne, S., Zupanec, N., Bunc, M., Gobec, S., Komel, R. (2014). Antifungal activity of cinnamic acid derivatives involves inhibition of benzoate 4-hydroxylase (CYP53). *Journal of Applied Microbiology*, 116(4), 955–966. <https://doi.org/10.1111/jam.12417>
12. Glendening, P.E.D., Reed, A.E., Carpenter, J.E., Weinhold, F. (1998). NBO Version 3.1, Theoretical Chemistry Institute and Department of Chemistry, University of Wisconsin, Madison.
13. Asif, F.B., Khan, F.L.A., Muthu, S., Raja, M. (2021). Computational evaluation on molecular structure (Monomer , Dimer), RDG , ELF , electronic (HOMO-LUMO, MEP) properties, and

- spectroscopic profiling of 8-Quinolinesulfonamide with molecular docking studies. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1198, 113169. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2021.113169>
14. Fathima, R.B., Prasana, J.C., Muthu, Abraham, C.S. (2019). Molecular docking studies, charge transfer excitation and wave function analyses (ESP, ELF, LOL) on valacyclovir: A potential antiviral drug. *Computational Biology Chemistry*, 78, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.11.014>
 15. Frisch, M.J., Trucks G.W., Schlegel, H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Ortiz J.V., Cioslowski J, Fox D.J. (2009). Gaussian 09, Revision A.02., Gaussian, Inc., Wallingford CT.
 16. Viana Nunes, A.M., das Chagas Pereira de Andrade, F., Filgueiras, L.A., de Carvalho Maia, O.A., Cunha, R.L.O.R., Rodezno, S.V.A., Maia Filho, A.L.M., de Amorim Carvalho, F.A., Braz, D.C., Mendes, A.N. (2020). preADMET analysis and clinical aspects of dogs treated with the Organotellurium compound RF07: A possible control for canine visceral leishmaniasis? *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 80, 103470. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103470>
 17. Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
 18. K V, Aarthi., Rajagopal, H., Muthu, S., Jayanthi, V., Girija, R. (2020). Quantum chemical calculations, spectroscopic investigation and molecular docking analysis of 4-chloro-N-methylpyridine-2-carboxamide. *Journal of Molecular Structure*, 1210, 128053. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128053>
 19. Morris, G.M., Huey R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., Olson A.J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools 4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 16, 2785-2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
 20. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1. 5.0.4, Schrodinger, LLC, 2009.
 21. Al-Zaqri, N., Pooventhiran T., Alsalmeh, A., Warad I., John A.M., Thomas R. (2020). Structural and physico-chemical evaluation of melatonin and its solution-state excited properties, with emphasis on its binding with novel coronavirus proteins. *Journal of Molecular Liquids*, 318, 114082. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114082>
 22. Thomas, R., Hossain, M., Mary, Y.S., Resmi, K.S., Armaković, S., Armaković, S.J., Nanda, A.K., Ranjan, V.K., Vijayakumar, G., Alsenoy, C.V. (2018). Spectroscopic analysis and molecular docking of imidazole derivatives and investigation of its reactive properties by DFT and molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Structure*, 1158, 156–175. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.01.021>
 23. Pandey, M., Muthu, S., Nanje Gowda N.M. (2017). Quantum mechanical and spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, ¹H, ¹³C NMR, UV-Vis) studies, NBO, NLO, HOMO, LUMO and Fukui function analysis of 5-Methoxy-1H-benzo[d]imidazole-2(3H)-thione by DFT studies, *Journal of Molecular Structure*, 1130, 511–521. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.10.064>

24. Asif, F.B., Khan, F.L.A., Muthu, S., Raja, M. (2020). Elaborated molecular structure, molecular docking and vibrational spectroscopic investigation of N-((4-aminophenyl)sulfonyl)benzamide with Density functional theory. *Chemical Data Collections*, 31, 100609. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2020.100609>
25. Jeeva, S., Muthu, S., Tamilselvan, S., Caroline, M.L., Purushothaman, P., Sevvanthi S., Vinitha G., Mani G. (2018). Growth, spectroscopic studies, and third order non-linear optical analysis of an organic dicarboxylic acid based single crystal: Urea Oxalic acid. *Chinese Journal of Physics*, 56, 1449–1466. <https://doi.org/10.1016/j.cjph.2018.05.021>
26. Politzer, P., Truhlar D. (2013). *Chemical Applications of Atomic and Molecular Electrostatic Potentials: Reactivity, Structure, Scattering, and Energetics of Organic, Inorganic, and Biological Systems*, Springer Science Business Media.
27. Murray, J.S., Sen, K. (1996). *Molecular Electrostatic Potentials Concepts and Applications*, Elsevier Science B.V., Amsterdam.
28. Shah, U., Patel, S., Patel, M., Gandhi, K., Patel, A. (2020). Identification of chalcone derivatives as putative non-steroidal aromatase inhibitors potentially useful against breast cancer by molecular docking and ADME prediction. *Indian Journal of Chemistry -Section B*, 59, 283–293.
29. Psimadas, D., Georgoulis, P., Valotassiou, V., Loudos, G. (2012). Molecular Nanomedicine Towards Cancer. *Journal of Pharmaceutical Science*, 101, 2271–2280. <https://doi.org/10.1002/jps>
30. Abraham, C.S., Muthu, S., Prasana, J.C., Armaković, S.J., Armaković, S., Rizwana, F.B., B.G. Ben. (2018). Spectroscopic profiling (FT-IR, FT-Raman, NMR and UV-Vis), autoxidation mechanism (H-BDE) and molecular docking investigation of 3-(4-chlorophenyl)-N,N-dimethyl-3-pyridin-2-ylpropan-1-amine by DFT/TD-DFT and molecular dynamics: A potential SSRI drug. *Computational Biology Chemistry*, 77, 131–145. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.08.010>
31. Thomas, R., Mary, Y.S., Resmi, K.S., Narayana, B., Sarojini, B.K., Vijayakumar, G., Van Alsenoy, C. (2020). Two neoteric pyrazole compounds as potential anti-cancer agents: Synthesis, electronic structure, physico-chemical properties and docking analysis. *Journal of Molecular Structure*, 1181, 455–466. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.01.003>
32. Pooventhiran, T., Bhattacharyya, U., Rao, D.J., Chandramohan, V., Karunakar, P., Irfan, A., Mary, Y.S., Thomas, R. (2020). Detailed spectra, electronic properties, qualitative non-covalent interaction analysis, solvatochromism, docking and molecular dynamics simulations in different solvent atmosphere of cenobamate, *Structural Chemistry*, 31, 2475–2485. <https://doi.org/10.1007/s11224-020-01607-8>
33. Thomas, R., Mary, Y.S., Resmi, K.S., Narayana, B., Sarojini, S. B. K., Armaković, S., Armaković, S. J, Vijayakumar, G., Van Alsenoy, C., Mohan, B.J. (2019). Synthesis and spectroscopic study of two new pyrazole derivatives with detailed computational evaluation of their reactivity and pharmaceutical potential. *Journal of Molecular Structure*, 1181, 599–612. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.01.014>.
34. Thamarai, A., Vadamar, R., Raja, M., Muthu, S., Narayana, B., Ramesh, P., Sevvanthi, S., Aayisha, S. (2020). Molecular structure conformational analyses, solvent-electronic studies

through theoretical studies and biological profiling of (2E)-1-(3-bromo-2-thienyl)-3-(4-chlorophenyl)-prop-2-en-1-one. *Journal of Molecular Structure*, 1202, 127349. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127349>

35. Chandralekha, B., Hemamalini, R., Muthu, S., Sevvanthi, S. (2020). Spectroscopic (FT-IR, FT-RAMAN, NMR, UV-Vis) investigations, computational analysis and molecular docking study of 5-bromo-2-hydroxy pyrimidine. *Journal of Molecular Structure*, 1218, 128494. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128494>
36. Raajaraman, B.R., Sheela, N.R., Muthu, S. (2018). Investigation on 1-Acetyl-4-(4-hydroxyphenyl) piperazine an anti-fungal drug by spectroscopic, quantum chemical computations and molecular docking studies. *Journal of Molecular Structure*, 1173, 583–595. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.07.030>



HASTANELERDE SIKLIKLA KULLANILAN BAZI DEZENFEKTAN VE ANTİSEPTİKLERİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF SOME DISINFECTANTS AND ANTISEPTICS WHICH ARE FREQUENTLY USED IN HOSPITALS

Süleyman KAYAN^{1*} , Nurten ALTANLAR¹ 

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

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada, bazı önemli enfeksiyon etkenlerinin çeşitli dezenfektan ve antiseptiklere olan duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Dezenfektan olarak; % 2 gluteraldehit, % 6 hidrojen peroksit solüsyonu, sodyum hipoklorit çözeltisi (NaClO) (1000ppm), antiseptik olarak; %70 etanol ile % 0,5 klorheksidin glukonat karışımı, % 70 izopropil alkol ile klorheksidin glukonat karışımı, % 70 izopropil alkol ve % 10 povidon-iyot, hastane enfeksiyonu etkeni olan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15542, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 referans suşlarına karşı kantitatif süspansiyon testi ile antimikrobiyal etkinliği değerlendirilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: Çalışmamızda % 10 povidon iyot solüsyonu dışındaki antiseptik ajanlar tüm mikroorganizmalara 30 saniye ve 1 dakika temas süreleri sonunda etkili bulunmuştur. Dezenfektan olarak kullandığımız % 2 gluteraldehit ve sodyum hipoklorit çözeltisi (NaClO) (1000 ppm) *P. aeruginosa* ATCC 15542 suşuna 1 dakika hariç diğer temas sürelerinde (5dk, 20dk) ve diğer bütün suşlara karşı tüm temas sürelerinde (1dk, 5dk, 20dk) antimikrobiyal aktivite göstermiştir. % 6 hidrojen peroksit solüsyonu ise *S. aureus* ATCC 6538, *P.aeruginosa* ATCC 15542, *S.aureus* ATCC 43300(MRSA) ve *S.aureus* ATCC 25923(MSSA) suşlarına karşı 1 dakika temas süresinde etkinlik gösterememiştir. En hızlı ve güçlü antimikrobiyal etkili antiseptikler olarak alkol bazlı (klorheksidin içeren) solüsyonlar ve dezenfektanlar olarak ise % 2 gluteraldehit ve sodyum hipoklorit (1000ppm) belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, antiseptik, dezenfektan, kantitatif süspansiyon testi.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Süleyman Kayan
e-posta / e-mail: skayan@ankara.edu.tr, Tel./ Phone: +903122033187

ABSTRACT

Objective: *In this study, aimed to determine the sensitivity of some important infectious agents to various disinfectants and antiseptics.*

Material and Method: *Antimicrobial efficacy of glutaraldehyde 2 %, hydrogen peroxide 6 %, sodium hypochlorite solution (NaClO) (1000ppm) as disinfectant solutions and ethanol 70 % -chlorhexidine gluconate mixture 0.5 %, isopropyl alcohol 70 % and chlorhexidine gluconate mixture, isopropyl alcohol 70 % and povidone-iodine 10 %, as antiseptic solutions was evaluated with quantitative suspension test against Staphylococcus aureus ATCC 6538, Pseudomonas aeruginosa ATCC 15542, Staphylococcus epidermidis ATCC 12228, Staphylococcus epidermidis ATCC 35984, methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ATCC 43300, methicillin sensitive Staphylococcus aureus (MSSA) ATCC 25923, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Escherichia coli ATCC 25922 reference strains that cause nosocomial infection.*

Result and Discussion: *In our study, antiseptic agents other than povidone iodine solution 10 % were found to be effective against all microorganisms tested after 30 seconds and 1 minute contact times. Glutaraldehyde 2 % and sodium hypochlorite solution (NaClO) (1000 ppm) were showed sufficient antimicrobial activity for P. aeruginosa ATCC 15542 strain at 5 min, 20 min contact times except 1 min and all contact times against all other strains. Hydrogen peroxide 6 % solution did not show antimicrobial efficacy against S. aureus ATCC 6538, P.aeruginosa ATCC 15542, S. aureus ATCC 43300 (MRSA) and S. aureus ATCC 25923 (MSSA) strains at 1 minute of contact time. As a result, it was determined that alcohol-based (with chlorhexidine) antiseptics and glutaraldehyde 2 % and sodium hypochlorite (1000ppm) disinfectants showed the fastest and strongest antimicrobial effect.*

Keywords: *Antimicrobial activity, antiseptics, disinfectants, quantitative suspension test*

GİRİŞ

Dezenfeksiyon; cansız maddeler ve yüzeylerde bulunan bakteri sporları dışındaki patojen mikroorganizmaların öldürülmesi veya üremelerinin inhibe edilmesi işlemidir. Bu işlem için kullanılan kimyasal ajanlara dezenfektan, aynı işlemin canlı doku üzerine uygulanmasında kullanılan kimyasallara da antiseptik denir [1].

Antiseptiklerin çoğu dezenfektanların daha düşük konsantrasyonlarda kullanılan formlarıdır. Deri ve mukoz membranlardaki mikrobiyal yükün azaltılması ya da yok edilmesi için ameliyat öncesinde veya çapraz kontaminasyonu önlemek için genel hijyen amaçlı olarak kullanılırlar. Deri ve mukoz membran için toksik ve iritan olmamalıdır [2].

Dezenfeksiyon, antisepsi ve sterilizasyon uygulaması çok eski zamanlara dayanır. Suların kaynatılması, saklanması için çömlek kapların yerine gümüş ve bakır kapların tercih edilmesi (ağır metallerin oligodinamik etkisi), sadece mekanik temizlikle yetinilmeyip yemekte kullanılan kapların ayrıca alevden geçirilmesi, kükürtün yakılarak tütsü olarak kullanılması ampirik dezenfeksiyon uygulanmasına verilecek en eski uygulamalar arasında yer alır. Loğusalık hummasının bulaşıcı olduğunu gösteren Semmelweis (1818-1865), bunu önlemek için dezenfektan kullanımını öneren, dezenfeksiyon ve antisepsinin bilimsel olarak başlangıcını simgeleyen ilk bilim insanı olarak bilinir. Lister (1827-1912) antiseptik olarak cerrahide fenolü ilk kullanan kişidir. 1886'da Loew tarafından formaldehit keşfedilmiş ve gaz formu 1890'da odaların dekontaminasyonu için uygulanmıştır. 1893'de Schimmelbusch cerrahlara önce ellerini su ve sabunla bir dakika süreyle fırçalamalarını, ardından da %

80'lik alkol emdirilmiş steril gaz beziyle kurulumalarını önermiştir. Dört değerli amonyum bileşikleri 1916'da bildirilmiş, 1950'lerde klorheksidin, 1960'larda gluteraldehit kullanıma girmiştir [3].

Hastane enfeksiyonları (nozokomiyal enfeksiyonlar), hastanın hastaneye yatışı sırasında inkübasyon durumunda olmayan, hastaneye yatıştan itibaren 48-72 saat sonra gelişen veya dahili hastalar için taburcu olmasının ardından 10 gün içerisinde, ameliyat geçiren hastalarda 1 ay, protez uygulanan hastalarda ise 1 yıl içerisinde ortaya çıkan, daha kısa ve güncel bir ifadeyle ise sağlık hizmetleri ile ilişkilendirilen enfeksiyonlardır. Hastane enfeksiyonları sadece hastalar için değil tıbbi personel, refakatçi ve ziyaretçiler için de büyük bir risk oluşturur. Yaşlı nüfusun artması, gelişen imkânlarla bağlı olarak yoğun bakımda yatan ve bağışıklık yetmezliği olan hasta sayısında artış ve buna bağlı olarak cerrahi ve invaziv girişimlerin artması hastane enfeksiyonu gelişimini hızlandırmaktadır. Hastane enfeksiyonları özellikle tedavisi daha zor ve pahalı, çoklu ilaç direnci gösteren mikroorganizmalarla, MRSA, genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) salgılayan enterik basiller, vankomisin dirençli enterokoklar (VRE), çoklu antibiyotik dirençli *Pseudomonas* ve *Acinetobacter spp.*, funguslar gelişmektedir [4].

Hastane ortamında antibiyotiklere karşı gelişen dirençte olduğu gibi dezenfektan ve antiseptiklere karşı gelişen direnç konusu da önem kazanmıştır. Direnç gelişimi saptanmış olan dezenfektanlar arasında klorheksidin, kloramin, povidon iyot, kuarterner amonyum bileşikleri, formaldehit, gluteraldehit, hidrojen peroksit sayılabilir. Uygun şekilde gerçekleştirilmeyen dezenfeksiyon işlemi sonrasında birçok mikroorganizma türünde biyositlere karşı duyarlılık oranlarında azalma olabileceği, adaptasyon, stres yanıt oluşumu, genetik direnç elemanlarının kazanılması ve biyofilm oluşumuna sebep olarak yüksek dirençli duruma gelebileceği bilinmektedir. Dezenfeksiyon işleminin yetersiz olması mikroorganizmalar için seleksiyona sebep olabilirken, dezenfeksiyon işlemi sonrasında yeterli yıkama yapılmadığı takdirde dezenfektanın rezidü subletal yoğunluktaki solüsyonları yapısında direnç genlerini bulunduran mikroorganizmaların seçilmesi, dirençli olmayan mikroorganizmaların adaptasyonuna ve direnç genlerinin kazanılmasına neden olabilir. Mikroorganizmaların üreme ortamında bulunan kirleri, organik materyaller, pH, ısı gibi faktörler de fenotipik direncin oluşmasına neden olabilir. Yapılan bir çalışmada; daha soğuk ve daha dilüe ortamlarda hayatta kalıp üreyebilen *Escherichia coli* suşlarının klorlamaya karşı direncinin yüksek olduğu saptanmıştır. Manto yani spor kabuğu dezenfektan maddelerin geçişine engel teşkil eder. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı yapısı dezenfektanlara karşı yeterli bir engel oluşturmaz. Stafilokoklar biyofilm oluşturarak setrimid, kloroksilenol ve klorheksidine direnç geliştirebilirler [5,6].

Çalışmamızda, hastane ortamında dezenfektan ve antiseptiklerin yaygın olarak ve hatalı kullanımı göz önünde bulundurularak, dezenfektan olarak; % 2 gluteraldehit, % 6 hidrojen peroksit solüsyonu, sodyum hipoklorit çözeltisi (NaClO) (1000ppm), antiseptik olarak; % 70 etanol ile % 0.5 klorheksidin glukonat karışımı, % 70 izopropil alkol ile klorheksidin glukonat karışımı, % 70 izopropil

alkol ve % 10 povidon-iyot çözeltisi nozokomiyal hastane enfeksiyonu etkeni olarak sıklıkla izole edilen önemli patojenlere karşı antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi ve Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Kültür Koleksiyonları'ndan temin edilen *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15542, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 standart suşları test edilmiştir. Dezenfektan olarak; % 2 gluteraldehit, % 6 hidrojen peroksit solüsyonu, sodyum hipoklorit çözeltisi (NaClO) (1000ppm), antiseptik olarak; % 70 etanol ile % 0.5 klorheksidin glukonat karışımı, % 70 izopropil alkol ile klorheksidin glukonat karışımı, % 70 izopropil alkol ve % 10 povidon-iyot kullanılmıştır.

Dezenfektanların mikroorganizmalar üzerindeki etkinliği EN 1040 kantitatif süspansiyon test yöntemi kullanılarak saptanmıştır. Dezenfektanların etkisinin istenilen süre sınırlarında doğru olarak saptanabilmesi için öncelikle dezenfektanın etkisini süre bitiminde ortadan kaldıracak olan nötralizanın uygunluğu Ekizoğlu ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandığı metotla test edilmiştir [7].

Uygun nötralizanın belirlenmesi için, kullandığımız dezenfektan ve antiseptik solüsyonundan 100 µl alınıp üzerine 900 µl steril distile su eklenmiştir. Vortekslendikten sonra karışımdan 100 µl alınıp 9900 µl uygun nötralizan içerisine eklenmiştir. Bu karışıma 0.5 McFarland bulanıklığına göre ayarlanmış standart bakteri süspansiyonlarından 0.1 ml ilave edilip 5 dakika süre ile bekletilmiştir. Daha sonra 10^{-5} 'e kadar dilüsyonları hazırlanmıştır. Tryptic soy agara (TSA) her bir dilüsyon örneğinden 100 µl alınıp yayma plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra, koloni sayımı yapılmış ve dilüsyon faktörü ile çarpılarak koloni oluşturan birim (kob) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu olarak ise steril distile su kullanılmıştır. Test petripleri ile kontrol petripleri aralarında fark görülmemesi ile nötralizanın uygun olduğu kabul edilmiştir. Sonuç olarak nötralizan sistemin; dezenfektanın etkisini ortadan kaldırdığı ve ayrıca üremeyi inhibe etmediği gösterilmiştir.

Dezenfektan etkinliğinin belirlenmesi için tryptic soy broth (TSB) içerisinde bulunan McFarland 0.5 değerine göre ayarlanmış bakteri süspansiyonundan (oda sıcaklığında) 100 µl alınarak 900 µl dezenfektan solüsyonu içerisine eklenmiştir. Antiseptikler için 30 saniye ve 1 dakika; dezenfektanlar için 1, 5 ve 20 dakika temas süresi olacak şekilde uygulanmıştır. Ardından hesaplanan temas süreleri sonunda karışımlardan 100 µl alınıp, 9900 µl nötralizan sistem (Ringer solüsyonu ile hazırlanmış % 0.5'lik Tween 80 çözeltisi) alkol bazlı antiseptikler için, Dey-Engley Neutralizing Broth ise diğer antiseptik ve dezenfektanlar) içine eklenip 10^{-1} 'den 10^{-3} 'e kadar dilüe edilmiştir. Her bir dilüsyon örneğinden 100 µl alınıp 3 TSA petrisi üzerine yayma plak yöntemiyle ekim yapılmış ve 37

°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan koloniler sayılmış ve koloni oluşturan birim (kob) dilüsyon faktörüyle çarpılarak hesaplanmıştır. Dezenfektanın etkinliği redüksiyon faktörüne göre hesaplanmış ve şu formül uygulanmıştır.

$$\text{Redüksiyon faktörü} = (\text{Log10 predezenfektanlı sayım} - \text{Log10 dezenfektanlı sayım})$$

Logaritmik azalmanın 5 veya daha büyük olması yeterli antimikrobiyal aktivite olarak kabul edilmiştir. Kontrol grubu olarak ise steril distile su kullanılmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Ringer solüsyonu ile hazırlanmış % 0.5'lik Tween 80 çözeltisinin alkol bazlı antiseptikler için, Dey-Engley Neutralizing Broth çözeltisinin ise diğer antiseptik ve dezenfektanlar için nötralizan etkili olduğu, kontrol grubuyla yapılan karşılaştırmada arasında fark gözlemlenmemesi ile tespit edilmiştir.

Uygun nötralizanın belirlenmesinden sonra antiseptik ve dezenfektanların etkinliği, kantitatif süspansiyon test yöntemi ile yapılarak antiseptikler için 30 saniye ve 1 dakika, % 10 povidon iyot için ayrıca 5 dakika, dezenfektanlar için 1-5-20 dakikalık temas sürelerinde belirlenmiştir [7].

Temas süreleri sonunda oluşan koloniler sayılmış ve mililitrede koloni oluşturan birim olarak belirtilmiştir. Redüksiyon faktörü dezenfektan etkisi olarak hesaplanmış, 5 ve yukarısı log10 redüksiyonları yeterli bakterisidal etkinlik olarak belirlenmiştir.

Redüksiyon faktörünü hesaplamak için yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak dilüsyon oranıyla çarpılmıştır.

$$\text{Redüksiyon faktörü} = \text{Log10 predezenfektanlı sayım} - \text{Log10 dezenfektanlı sayım}$$

Çalışmamızda antiseptik olarak kullandığımız % 70 etanol ile % 0.5 klorheksidin glukonat karışımı, % 70 izopropil alkol ile klorheksidin glukonat karışımı ve % 70 izopropil alkol tüm mikroorganizmalara 30 saniye ve 1 dakika temas süreleri sonunda etkili bulunmuş fakat % 10 povidon iyot solüsyonu ise sadece *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşlarına karşı etkinlik göstermiştir. % 10 povidon iyot solüsyonu, ürün etiketinde önerilen temas süresi olan 5. dakikada ise *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 suşu hariç diğer tüm suşlara karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Tablo 1).

Dezenfektan olarak kullandığımız % 2 glutraldehit solüsyonu ve sodyum hipoklorit çözeltisi (NaClO) (1000 ppm) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15542 suşuna 1. dakika hariç diğer temas sürelerinde (5 dk, 20 dk) ve diğer bütün test suşlarına karşı tüm temas sürelerinde (1 dk, 5 dk, 20 dk) yeterli antimikrobiyal aktivite göstermiştir. % 6 hidrojen peroksit solüsyonu ise *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15542, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 suşlarına karşı 1 dakika temas süresinde etkinlik gösterememiştir. Ancak 5 ve 20 dakika temas süresinde bu suşlara karşı ve tüm temas sürelerinde diğer suşlara karşı yeterli antimikrobiyal aktivite saptanmıştır (Tablo 2).

Tablo 1. Standart suşların belirli temas sürelerinde antiseptiklere karşı redüksiyon değerleri

Antiseptikler	% 70 etanol, klorheksidin glukonat % 0.5		% 70 izopropil alkol, klorheksidin glukonat		% 70 izopropil alkol		% 10 povidon-iyot		
	30s	1dk	30s	1dk	30s	1dk	30s	1dk	5dk
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	8.03	8.03	8.03	8.03	8.03	8.03	1.92	3.03	7.17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15542	8.07	8.07	8.07	8.07	8.07	8.07	3.05	3.39	7.07
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	8.43	8.43	8.43	8.43	8.43	8.43	1.07	1.17	3.87
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	8.67	8.67	8.67	8.67	8.67	8.67	1.12	1.61	7.16
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	8.15	8.15	8.15	8.15	8.15	8.15	5.24	8.54	8.54
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	7.95	7.95	7.95	7.95	7.95	7.95	1.04	1.14	7.04
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	7.65	7.65	7.65	7.65	7.65	7.65	7.84	7.84	7.84
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	7.93	7.93	7.93	7.93	7.93	7.93	7.84	7.84	7.84

En hızlı ve etkili dezenfektan olarak ise % 2 glutaraldehit ve sodyum hipoklorit (1000 ppm serbest klor) belirlenmiştir. % 2 glutaraldehit ve sodyum hipoklorit (1000 ppm serbest klor), % 6 hidrojen peroksit göre daha hızlı antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. % 6 hidrojen peroksitin genel kullanımda yeterli aktivite gösterebilmesi için daha uzun temas süresi gerektirmesi (yüksek düzey dezenfektan etki için 5-10 dakika) bunun sebebi olarak gösterilebilir.

Avcı ve arkadaşları, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, vankomisin dirençli *Enterococcus* bakterileri üzerinde, antiseptik ve dezenfektanlardan hastanelerde en sık kullanılan povidon-iyot (%10), sodyum hipoklorit (%5), etil alkol ve glutaraldehitin (%2) antimikrobiyal etkinliğini araştırdıkları çalışmada tüm sulandırmalarda 1 dakikalık karşılaşma sonrası tüm bakterilerin üremesini inhibe eden povidon-iyot (%10) en etkili antiseptik olarak tespit edildi [8]. Direkt ve 1/2 sulandırmada yine 1 dakikada tüm bakterilerin üremesini inhibe eden glutaraldehit (%2) en etkili dezenfektan olarak gözlemlendi. Sodyum hipoklorit (%5) 1/10 sulandırmada kullanıldığında 1 dakikalık temas ile tüm bakterilerin üremesini inhibe ederken, 1/100 sulandırmada tüm bakterileri öldürmek için en az 5 dakika süre ile uygulanması, etil alkolün ise %70'lik konsantrasyonunun bakterilerle en az 2 dakika temasının uygun olduğu saptandı [8].

Tablo 2. Standart suşların belirli temas sürelerinde dezenfektanlara karşı redüksiyon değerleri

Dezenfektanlar	Sodyum hipoklorit (NaClO)1000 ppm			% 2 gluteraldehit			% 6 Hidrojen peroksit solüsyonu		
	30s	1dk	5dk	30s	1dk	5dk	30s	1dk	5dk
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	8.06	8.06	8.06	8.06	8.06	8.06	1.43	8.51	8.51
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15542	3.19	7.36	7.36	1.59	7.36	7.36	1.19	7.36	7.36
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	1.86	8.60	8.60
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	8.90	8.90	8.90	8.90	8.90	8.90	2.54	8.90	8.90
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	8.54	8.54	8.54	8.54	8.54	8.54	8.54	8.54	8.54
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	8.07	8.07	8.07	8.07	8.07	8.07	8.07	8.07	8.07
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	7.84	7.84	7.84	7.84	7.84	7.84	7.84	7.84	7.84
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	7.84	7.84	7.84	7.84	7.84	7.84	7.84	7.84	7.84

Fıçı ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde sıklıkla izole edilen nozokomiyal infeksiyon etkeni bakteriyel patojenlere karşı (25 Gram pozitif, 19 Gram negatif), aynı hastanede rutin olarak kullanılan 7 farklı dezenfektan (benzalkonyum klorit, sodyum hipoklorit, povidon-iyot, klorheksidin glukonat, gluteraldehit, "% 0.5'lik pentandiol + % 12'lik ethandiol + % 7.5'lik didesil-dimetil amonyum klorit" karışımı, etoksiamino akridin) modifiye Kelsey-Sykes yöntemi ile etkinlikleri yönünden araştırılmıştır [9]. Klorheksidin glukonat, gluteraldehit ve povidon-iyotun bütün bakterilere karşı en etkili dezenfektan olduğu belirlenmiştir [9].

Buluş ve Kaleli, 18 katılımcı ile % 7.5 povidon iyot, % 4 klorheksidin glukonat ve sıvı sabunun total bakteri sayısında ellerde ani, kalıcı ve birikici etkilerini karşılaştırdığı çalışmada, % 7.5 povidon iyot antimikrobiyal etkinlik yönünden sıvı sabuna üstünlük gösterirken, % 4 klorheksidin glukonatın ise her 2 ürüne olan üstünlüğü istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur [10]. % 7.5 povidon iyot ve % 4 klorheksidin glukonat arasında kalıcı etki açısından anlamlı fark saptanmazken diğer iki antiseptik solüsyonunun aksine sıvı sabun birikici etki göstermemiştir [10]. Sonuç olarak % 4 klorheksidin glukonatın ani, kalıcı ve birikici etkide gösterdiği başarısı sebebiyle hastanelerde el antiseptiği olarak tercihinin uygun olacağı görüşüne varılmıştır [10].

Atabek ve arkadaşlarının dezenfeksiyon ajanlarının zamana bağlı olarak ölçü malzemeleri üzerinde etkilerini değerlendirdikleri çalışmada, *Corynebacterium diphtheriae*, Neisseria, α -hemolitik Streptokoklar, non-hemolitik Streptokoklar, koagülaz negatif Stafilokoklar ve Bacillus türlerine karşı 3

dakika süresinde % 7.5 povidon iyot (PI), % 1 sodyum hipoklorit (SH) uygulamalarının ölçü maddelerinin dezenfeksiyonunda başarılı olduğu sonucuna varılmıştır [11].

Mısırlı çalışmasında, fosfat, klor, kuarternar amonyum bileşikleri ve alkol içeren dezenfektanların % 0.1, % 0.5 konsantrasyonlarda; 1, 3, 5, 10 ve 15 dakika temas sürelerinde etkinlikleri TSE EN 1276 süspansiyon test yöntemi ile araştırmıştır [12]. Sonuç olarak fosfatlı dezenfektanların *E. coli* üzerinde, kuarternar amonyum bileşiklerinin *S. aureus*'a karşı çok etkili olduğu saptanmıştır. Klorlu dezenfektanların hem *E. coli* hem de *S. aureus*'a karşı, alkollü dezenfektanın ise bütün mikroorganizmalara karşı etkin olduğu belirlenmiştir [12]. Benzer şekilde çalışmamızda da alkol ve klor bazlı (sodyum hipoklorit çözeltisi (NaClO) (1000 ppm)) dezenfektanlar yeterli antimikrobiyal aktivite göstermişlerdir [12].

Saraç'ın 2009 yılındaki çalışmasında; antiseptik olarak; Zefan (% 10 Benzalkonyum klorür), Sterillium (propan-2-ol, Propan-1-ol, mesetronyum etilsulfat), Batticon (% 7.5 Povidon-iyot), Klorheks (%4 Klorheksidin glukonat) ve Opaşjel 10-70 (İzopropil alkol, Etil alkol) *S. aureus* ATCC 6538, *P.aeruginosa* NCTC 6749 suşlarına karşı dezenfektan olarak; Savonol 2 (% 2 glutaraldehit), Gludex FF (% 2 glutaraldehit) ve Mooncid®Endo (% 2 glutaraldehit) *Bacillus subtilis* var. niger ATCC 9372, *Candida albicans* ATCC 10231, *S. aureus* ATCC 6538, *P.aeruginosa* NCTC 6749 suşlarına karşı kantitatif süspansiyon test yöntemiyle etkinlikleri araştırılmıştır [13]. Gludex FF ve Zefan en etkili kimyasal ajanlar olarak belirlenmiş, Batticon (% 7,5 Povidon-iyot) en az etkili antiseptik olarak saptanmıştır [13]. *B. subtilis* var. niger ATCC 9372 suşuna karşı Mooncid® Endo 5, 15, 30 dk olmak üzere tüm sürelerde etkisiz olurken, Gludex FF ve Savonol 2 ancak 30 dk temas süresinde antimikrobiyal aktivite gösterebilmiştir [13]. Çalışmamızda da benzer şekilde alkol ve klorheksidin içeren antiseptikler ve % 2 glutaraldehit ise sodyum hipoklorit çözeltisi (NaClO) (1000 ppm) ile beraber en etkili kimyasal ajan olarak saptanmıştır.

Ekizoğlu ve arkadaşları kantitatif süspansiyon testi ile yaptıkları bir diğer çalışmada, % 4 klorheksidin diglukonat'ın 5 dakikalık temas süresi sonunda antibiyotik dirençli ve duyarlı bakterilere karşı etkin olduğunu ve güvenli bir şekilde hastanelerinde kullanılabileceğini göstermişlerdir [7]. Ancak, klorheksidin konsantrasyonu azaldığında, özellikle *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* için, bakterisidal aktivitede azalma tespit edilmiştir [7].

Ersöz ve arkadaşlarının, santral ve periferik venöz katater uygulamalarında oktenidin hidroklorür, klorheksidin diglukonat ve povidon iyodürün antiseptik etkilerinin karşılaştırılmasının amaçlandığı çalışmasında, oktenidin hidroklorür, klorheksidin diglukonat ve povidon iyodür antiseptik solüsyonları arasında antimikrobiyal etkinlik açısından anlamlı bir fark bulunmadığı saptanmıştır [14].

Gürpınar ve arkadaşlarının hastanelerde sıklıkla kullanılan antiseptiklerin, kantitatif süspansiyon testi ile antimikrobiyal etkinliğinin araştırıldığı çalışmada (% 70 etanol ve % 0.5 klorheksidin diglukonat karışımı, % 70 (2- propanol) ve klorheksidin diglukonat karışımı, % 70 (2-

propanol), % 7.5 povidon iyot, % 10 povidon iyot), biyofilm oluşturan (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984) ve biyofilm oluşturmeyen (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228) suşlarına karşı 30 saniye ve 1 dakika sürelerinde yeterli antibakteriyel etki saptanmıştır [15].

Herruzo ve arkadaşları % 5 klorheksidin ve % 10 povidon iyot içerikli sabunlarla yaptıkları çalışmalarında % 5 klorheksidin içerikli örneklerle daha iyi antibakteriyel etki sağlandığını göstermişlerdir [16].

Ohtake ve arkadaşları, yoğun kemoterapi alan hastalarda santral venöz katater yerleştirilmeden önce cilt dezenfeksiyonu için % 70 alkol + % 1 klorheksidin glukonatın etkinliğinin povidon iyot ile karşılaştırıldığı çalışmada, povidon iyot ile karşılaştırıldığında % 70 alkol + % 1 klorheksidin glukonatın hematolojik maligniteleri olan hastalarda advers deri reaksiyonlarına neden olmadan kateterle ilişkili enfeksiyonu potansiyel olarak azalttığı tespit edilmiştir [17].

Lee ve arkadaşlarının çalışmasında, klorheksidin kullanımı ve venöz giriş için uygun bir alanın seçilmesi sonucunda kateter ilişkili enfeksiyon insidansının azaldığı tespit edilmiştir [18].

Andonissamy ve arkadaşlarının yürüttüğü, tam protezlerden izole edilen *Staphylococcus aureus* ve viridans streptokokal bakteri türlerine karşı farklı zaman dilimlerinde kullanılan çeşitli dezenfektanların antibakteriyel etkinliğinin kaydedilmesinin amaçlandığı çalışmada, biyofilm oluşturan *S. aureus* için, % 2 glutaraldehit en iyi antibakteriyel etkinliği göstermiş ve bunu % 1 sodyum hipoklorit ve % 3.8 sodyum perborat izlemiştir [19]. Biyofilm oluşturan viridans streptokok türleri için ise % 2 glutaraldehit en iyi antibakteriyel etkinliği göstermiştir [19].

Yılmaz ve arkadaşlarının, ameliyat öncesi klorheksidin glukonatla yapılan duşun cerrahi alan enfeksiyonunu azaltmadaki rolünün araştırıldığı 120 hastadan oluşan hasta grubuyla yapılan çalışmada klorheksidin glukonatın etkinliği ciltteki bakteri kolonizasyonu açısından değerlendirilmiştir [20]. Neisseria, Corynebacterium, Micrococcus ve alfa Streptokok türlerini azaltmada etkisiz olduğu ancak koagülaz negatif stafilokokları (KNS) azaltmada etkili olduğu saptanmıştır [20].

Yiğit ve arkadaşlarının çalışmasında, % 0.08'lik sodyum hipoklorit ve % 3.5'lik povidon iyot solüsyonu, biyofilm oluşturan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 suşları üzerindeki etkinliği modifiye Kelsey-Sykes metodu kullanılarak değerlendirilmiştir [21]. Povidon iyot (% 0.35) ile 2 dk maruziyet sonucu *S. aureus* ve *S. epidermidis* suşlarındaki bakterilerin tamamı ölürken, *E. coli* ve *P. aeruginosa* suşlarındaki bakterilerin bir kısmı yaşamış ve kültürde yeniden üreme olmuştur [21]. Sodyum hipoklorit (% 0.08) ile 2 dk maruziyet sonucu bakterilerin tamamı ölürken, *P. aeruginosa* suşlarındaki bakterilerin bir kısmı yaşamış ve kültürde yeniden üreme gerçekleşirken sodyum hipoklorit (% 0.08) ve povidon iyot (% 0.35) ile 5 dk maruz kalındığında ise tüm bakteri suşlarını öldürdüğü saptanmıştır [21].

Referans suş olarak seçtiğimiz enfeksiyon etkeni mikroorganizmalarla yaptığımız çalışmada bulduğumuz sonuçlar genel olarak bu alanda yapılan çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik göstermiştir.

Çalışmamızda kullandığımız antiseptikler ve dezenfektanlar özellikle hastanelerde farklı amaçlarla ve sıklıkla kullanılmaktadır. Dezenfektan ve antiseptiklerin doğru seçilmesi ve kullanımı başta hastane enfeksiyonlarını önlemede, dirençli mikroorganizma suşlarının gelişmesini sınırlamada ve hastane dışında da yaygın kullanımı olmasıyla oldukça önemlidir. Bunun için dezenfektan ve antiseptiklerin istenen antimikrobiyal etkinliği gösterdiğinin tayini için, güvenilir yöntemlerle özellikle hastane enfeksiyonuna yol açan mikroorganizmalar üzerinde test edilmesi büyük önem taşır.

Bu alanda konunun önemi göz önüne alınarak, daha çok sayıda mikroorganizma suşu, hastane izolatu ile dezenfektanların ve antiseptiklerin aktivitelerini etkileyen farklı koşullar da testin içeriğine uygun olarak sağlanıp, daha farklı etkinlik testi ile karşılaştırmalı olarak yapılması gerekmektedir. Bununla ayrıca, dezenfektan ve antiseptikler için hangi test yönteminin en güvenilir olduğu hususuna da ışık tutulacaktır.

YAZAR KATKILARI

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

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Günaydın, M., Esen, Ş., Perçin, D., Zenciroğlu D. (2015). Sterilizasyon Dezenfeksiyon Rehberi, Yayın No:13. ISBN: 978-605-84584-4-4
2. Gorman, S.P, Scott, E.M, Hugo, W.B, Russell, A.D. (1998). Pharmaceutical Microbiology, 6th ed. Blackwell Science, London. Chapter10: Chemical Disinfectants, Antiseptics and Preservatives. doi:10.1002/9780470988329
3. Töreci, K. (2003). Dünden Bugüne Sterilizasyon, Dezenfeksiyon, Antisepsi. 3. Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon Kongresi Kitabı.
4. Öztürk, R. (2008). Hastane enfeksiyonları: sorunlar, yeni hedefler ve hukuki sorumluluk. Hastane Enfeksiyonları Korunma ve Kontrol Sempozyumu (Sempozyum Kitabı) İstanbul, 10-11.





5. Russell, A.D, Hugo, W.B. (1998). *Pharmaceutical Microbiology*, 6th ed., Blackwell Science, London. Chapter 13: Resistance To Non-Antibiotic Antimicrobial Agents. doi:10.1002/9780470988329
6. Şencan, İ. (2003). *Dezenfektanlara Direnç Sorunu ve Pratik Önemi*. 3. Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon Kongresi Kitabı.
7. Ekizoğlu, M., Sağiroğlu, M., Kılıc, E., Haşçelik, A.G. (2016). An investigation of the bactericidal activity of chlorhexidine digluconate against multidrug-resistant hospital isolates. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 46(3), 903-909. doi: 10.3906/sag-1503-140
8. Avcı, D., Otkun, M (2017). Evaluation of Antibacterial Activities of Some Antiseptics and Disinfectants. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 74(3), 211-220.
9. Fıçıcı, S.E., Durmaz, G., İlhan, S., Akgün, Y., Köşgeroğlu, N. (2002). Yaygın kullanılan antiseptik/dezenfektanların nozokomiyal bakteriyel patojenler üzerindeki etkinlikleri ve antibakteriyel ve biyosit direnç ilişkisi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 36(3-4), 259-269.
10. Buluş, N., Kaleli, İ. (2004). Çeşitli antiseptiklerin el yıkama sonrası antibakteriyel etkilerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 38(1-2), 137-143.
11. Atabek, D., Alaçam, A., Tüzüner, E., Polat, S., Sipahi, A. B. (2009). In-vivo evaluation of impression material disinfection with different disinfectant agents. *Clinical Dentistry and Research*, 33(2), 52-59.
12. Mısırlı, F. (2009). Yüksek Lisans Tezi. Gıda Üretim Tesislerindeki Farklı Yüzeyle Uygulanan Değişik İçerikli Dezenfektanların Bazı Patojen Mikroorganizmalar Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye
13. Saraç, S. (2009). Yüksek Lisans Tezi. Sanayide Kullanılan Dezenfektan ve Antiseptik Maddelerin Antimikrobiyal Etkinliğinin Araştırılması. Biyoloji Anabilim Dalı, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye
14. Ersöz, Ş.E., Akkaya, A., Koçoğlu, E., Tekelioğlu, Ü.Y., Demirhan, A., Bilgi, M., Koçoğlu, H. (2016). Oktenidin hidroklorür, klorheksidin diglukonat ve povidon iyodürün, santral ve periferik venöz kateter uygulamalarında antiseptik etkilerinin karşılaştırılması. *Abant Tıp Dergisi*, 5(1), 16-22. doi: 10.5505/abantmedj.2016.94824
15. Eryılmaz, M., Gürpınar, S.S. (2017). Investigation of the antibacterial efficacy of some commonly used antiseptics in hospitals against biofilm forming and non-biofilm forming *Staphylococcus epidermidis* strains. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 41(1), 1-8. doi: 10.1501/Eczfak 0000000590
16. Herruzo, R., Vizcaino, M.J., Yela, R. (2018). Surgical hand preparation with chlorhexidine soap or povidone iodine: new methods to increase immediate and residual effectiveness, and provide a safe alternative to alcohol solutions. *Journal of Hospital Infection*, 98(4), 365-368. doi: 10.1016/j.jhin.2017.10.021
17. Ohtake, S., Takahashi, H., Nakagawa, M., Uchino, Y., Miura, K., Iriyama, N., Nakayama T., Hatta Y, Takei, M. (2018). One percent chlorhexidine-alcohol for preventing central venous

- catheter-related infection during intensive chemotherapy for patients with haematologic malignancies. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 24(7), 544-548. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.03.001>
18. Lee, K.H., Cho, N.H., Jeong, S.J., Kim, M.N., Han, S.H., Song, Y.G. (2018). Effect of central line bundle compliance on central line-associated bloodstream infections. *Yonsei Medical Journal*, 59(3), 376. <https://doi.org/10.3349/ymj.2018.59.3.376>
 19. Andonissamy, L., Karthigeyan, S., Ali, S.A., Felix, J.W. (2019). Effect of Chemical Denture Disinfectants and Tree Extracts on Biofilm-forming *Staphylococcus aureus* and Viridans Streptococcus Species Isolated from Complete Denture. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 20(11), 1307-1314. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-2712>
 20. Yılmaz, A. (2019). Yüksek Lisans Tezi. Ameliyat öncesi klorheksidin glukonat ile yapılan cilt temizliğinin bakteri kolonizasyonu ve cerrahi alan enfeksiyonlarını azaltmasındaki rolü, Maltepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
 21. Yiğit, Ş., Akar, M.S., Özbek, E. (2020). Ortopedik Enfeksiyonların Tedavisinde Sodyum Hipoklorit'in Yeri Var mıdır?. *Dicle Tıp Dergisi*, 47(2), 469-475. doi:10.5798/dicletip.755778



CUPANIOSCORDUM SEKSİYONUNA AİT ÜÇ ALLIUM L. (AMARYLLIDACEAE) TÜRÜNÜN YAPRAK VE SKAPUS ANATOMİSİ

LEAF AND SCAPE ANATOMY OF THREE ALLIUM L. (AMARYLLIDACEAE) SPECIES
FROM SECT. CUPANIOSCORDUM

Gülnur EKŞİ^{1,*} , Gülderen YILMAZ¹ , Mehmet BONA² ,
Ayşe Mine GENÇLER ÖZKAN¹ 

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

²İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Botanik Anabilim Dalı, 34134, İstanbul, Türkiye

ÖZ

Amaç: *Allium L. (Amaryllidaceae)* cinsi Türkiye’de doğal yayılış gösteren en geniş monokotil cinslerdendir. Soğan, sarımsak ve diğer *Allium* türleri geçmişte ve günümüz tedavi sistemlerinde yer alan önemli terapötik ajanlardır. Antioksidan, antikanser, antitrombotik, antidiyabetik, antimikrobiyal, antihipertansif, antigangren, aterosklerotik, hipokolesterolemik, antimutajenik, antiastmatik, antiaterojenik, bağışıklık düzenleyici ve prebiyotik olarak, birçok kronik hastalığı iyileştirici etkilerinden dolayı dünya genelinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Cinsinin taksonomisinin aydınlatılması, biyoaktivite çalışmaları için son derece önemlidir. Bu çalışmada, *Allium* cinsine ait *Cupanoscordum* seksiyonundan yakın akraba üç türün, *A. callidiction*, *A. peroninianum* ve *A. hirtovaginatum*, yaprak ve skapus anatomilerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Doğal ortamlarından toplanan canlı bitkilere ait skapus ve yaprak kısımları anatomik çalışma yapmak üzere %70’lik alkol içinde muhafaza edilmiştir. Skapus ve yaprak örneklerinden elle alınan enine kesitler sartur reaktifli ile muamele edilerek preparatlar hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatların anatomik fotoğrafları 4x, 10x veya 40x büyültmelerde, mikroskoba bağlı Leica CME kullanılarak çekilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: *A. callidiction*, *A. peroninianum* ve *A. hirtovaginatum* yakın türleri anatomik olarak birbirlerinden yaprakların ventral ve dorsalindeki iletim demetlerinin sayısı büyüklüğü bakımından ayrılırlar.

Anahtar Kelimeler: Anatomi, *Allium callidiction*, *Allium peroninianum*, *Allium hirtovaginatum*, Türkiye

ABSTRACT

Objective: The genus *Allium L.* is one of the largest monocot genera and naturally distributes in Turkey. Onion, garlic and other *Allium* species are among the important therapeutic agents in past and present treatment systems. They are widely used as antioxidant, anticancer, antithrombotic, antidiabetic, antimicrobial,

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Gülnur Ekşi
e-posta / e-mail: gulnur_eksi@yahoo.com

antihypertensive, antigangrene, atherosclerotic, hypocoesterolemic, antimutagenic, antiasthmatic, antiatherogenic, immunomodulator and prebiotic all around the world due to their healing effects on many chronic diseases. Taxonomic elucidation of the genus is extremely important for bioactivity studies. In this study, we aimed to compare the leaf and scape anatomy of closely related species A. callidiction, A. peroninianum and A. hirtovaginatatum belong to sect. Cupanioscordum.

Material and Method: *Scape and leave samples of living plants collected during the field trip were preserved in 70% alcohol for anatomical study. Cross-sections from scape and leaf samples were treated with sartur reagent and slides were prepared. Anatomical photographs of the preparation were taken at 4x, 10x or 40x magnifications by Leica CME.*

Result and Discussion: *A. callidiction, A. peroninianum and A. hirtovaginatatum species are anatomically differentiated from each other in terms of the number and shape of vascular bundles.*

Keywords: *Anatomy, Allium callidiction, Allium peroninianum, Allium hirtovaginatatum, Turkey*

GİRİŞ

Allium L. cinsi dünya genelinde 900'den fazla, ülkemizde ise yaklaşık 220 türle temsil edilmektedir. *Allium* cinsi bir tür hariç (*A. synnotii* G. Don) Kuzey Yarımkürede yayılış göstermektedirler [1]. Daha çok Güneybatı ve Orta Asya'da, ikinci ve nispeten küçük yayılışı ise Kuzey Amerika'da görülür [2–9] Türkiye, dünyada *Allium* cinsinin başlıca yayılış gösterdiği Güneybatı Asya bölgesine dâhil olmakla kalmaz, en fazla tür sayısı ile en geniş yayılışın da sahibidir [10–12]. *A. sativum* L. (sarımsak) ve *A. cepa* L. (soğan) yanında; *A. porrum* L. (pırasa), *A. fistulosum* L. (yeşil soğan), *A. ascalonicum* L. (arpacık soğanı), *A. ursinum* L. (yabani sarımsak), *A. ampeloprasum* L. (kaya sarımsağı, dağ körmeni), *A. schoenoprasum* L. (sirmo), *A. tuberosum* L. (frenk soğanı) gibi mutfağın vazgeçilmezi olan türlerin de yer aldığı *Allium* cinsinin tıbbi bitki olarak kullanımları tarih öncesi çağlara dayanmaktadır.

Allium, biyoaktif maddeler bakımından oldukça zengin olup bu konuda yapılmış sayısız çalışmanın da ortaya koyduğu üzere birçok aktiviteye sahip, farmasötik botanik açıdan değerli bir cinstir. *Allium* cinsi üzerine yapılan kimyasal çalışmalarda 200'den fazla bileşiğin varlığı tespit edilmiştir [13, 14]. Hipolipidemik, antikanser, antitrombotik, antidiyabetik, antimikrobiyal, antioksidan, antihipertansif, antigangren, antiaterosklerotik, antikolesterolemik, antimutajenik, antiastmatik, antiaterojenik, bağırsıklık düzenleyici ve prebiyotik olarak birçok kronik hastalığı iyileştirici etkilerinden dolayı dünya genelinde yaygın olarak kullanılmaktadır [15–24]. *Cupanioscordum* Cheschmejiyev seksiyonu genellikle Akdeniz havzasında yayılış gösteren nispeten küçük bir seksiyondur. Seksiyonun diyagnostik karakterleri şöyledir: Kahverengi, ağsı–fibrilli soğan dış tunikası; ipliksi silindirik, yarı silindirik, yarı çıplaktan sık tüylüye kadar yapraklar; kalıcı, tabanda koni şeklinde tüp oluşturan ve pediselleri birbirine az çok paralel olacak şekilde saran spatula; az sayıda çiçeğe sahip, tek tarafa meyilli, koni şeklinde (nadiren yarı küresel) umbella; silindirik-ursetolat perigon; perigondan kısa beyaz-pembe, pembe-mor filamentler; iyi gelişmiş nektaryumlara sahip ovaryum; perigondan kısa kapsül [25]. Seksiyonun taksonomik sınırlarının belirlenmesi çalışmaları halen devam etmektedir. Türkiye'de bu seksiyona üye üç tür yüksek oranda polimorfizm göstermektedirler. Türlerin ayırım karakterleri kimi

zaman iç içe geçmektedir. Cins içi taksonomik problemlerin çözümünde morfolojik verilerin yanında filogenetik, kemotaksonomik, anatomik bulgular da son derece belirleyicidir [5, 7]. Bu çalışmada, Türkiye’de *Cupanoscordum* Cheshmedzhiev seksiyonuna ait doğal yayılış gösteren üç *Allium* türünün, *A. callidiction* C.A.Mey. ex Kunth, *A. peroninianum* Azn. ve *A. hirtovaginatam* Kunth, bitki anatomisi çalışmalarında karakteristik özelliklerin sergilenmesi açısından önemli olan skapus ve yaprak anatomileri aydınlatılmış ve karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, ayırt edici karakterlerin kesin çizgilerle belirlenmesinde cinsin taksonomisine katkı sağlamıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Arazi çalışmasında toplanan canlı bitkilere ait gövde, yaprak kısımları anatomik çalışma yapmak üzere %70’lik alkol içine alınmıştır. Skapus ve yaprak örneklerinden elle alınan enine kesitler Sartur ve/veya kloral hidrat reaktifleri ile muamele edilerek preparatlar hazırlanmıştır. Hazırlanan yaprak ve skapus preparatlarının anatomik fotoğrafları 4x, 10x veya 40x büyültmelerde, mikroskoba bağlı Leica CME (Almanya) fotoğraf makinesi kullanılarak çekilmiştir.

Tablo 1. Bitki materyallerinin toplandığı lokaliteler

Tür adı	Lokalite	Herbaryum numarası
<i>Allium peroninianum</i> Azn.	İstanbul: Kayış Dağı Etekleri, 400m, 10 viii 2014, G. Ekşi & M. Bona	AEF 26662
<i>Allium hirtovaginatam</i> Kunth	Muğla: Fethiye–Dalaman arası, Kargı Köyü’ne varmadan, ağaçlandırma sahası, 150–200 m, 13 viii 2016, G. Ekşi & M. Bona	AEF 26500
<i>Allium callidiction</i> C.A.Mey. ex Kunth	Malatya: Akçadağ, Levent road, rocky places, 1050 m, 12 vii 2014, G. Ekşi & M. Bona	AEF 26660

SONUÇ VE TARTIŞMA

Allium callidiction C.A.Mey. ex Kunth.

Holotip: IRAN. [N.W. Iran] Persia borealis [in collibus sterilissimis lapidosis circa Khoi et Seidschadzi provo Aderbidjan, Szovits 484].

Sinonim: *A. araxanum* Fomin, *A. fimbriatum* Schischkin, *A. incisum* Fomin.

Çiçeklenme: Haziran-Ağustos. **Fitocoğrafik Bölge:** İran-Turan elementi. **Yayılış ve Habitat:** Kuzeybatı İran, Irak, Türkiye. *Allium callidiction* türü Doğu Anadolu Bölgesi’nde 1000–2300 m arası yüksekliklerde doğal yayılış göstermektedir. **Taksonomik not:** *A. callidiction* türü renk ve iç-tepal ucu

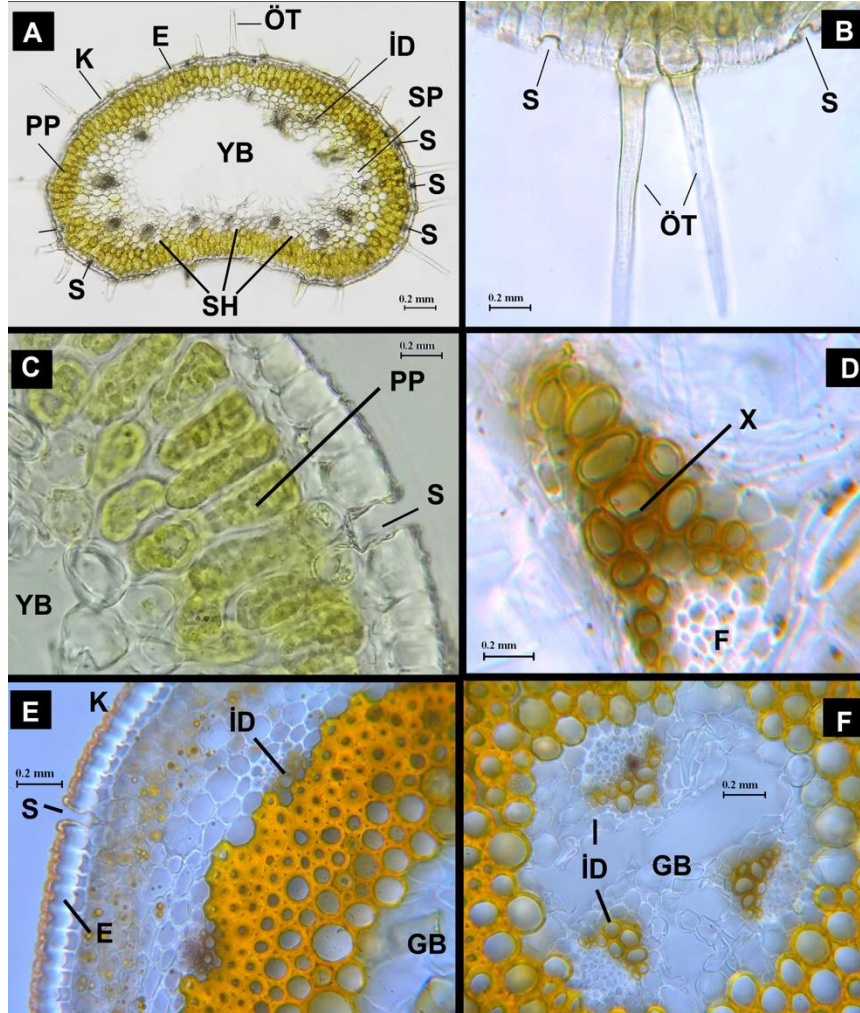
parçalanması bakımından değişken bir türdür [26]. Taksonomik olarak en yakın türü Türkiye için endemik bir tür olan *A. peroninianum* türüdür.

Yaprak enine kesiti böbrek şeklindedir. Epidermisin dışa bakan duvarı kalınlaşmış ve dışarıdan iyi gelişmiş, yüzeyi hafifçe dentikulat bir kütikula ile çevrelenmiştir. Epidermis üzeri tek hücreli örtü tüyleri ile kaplıdır. Dağınık halde bulunan stomalar tüm yaprak yüzeyini kaplar. Parenkimatik doku; palizat parenkiması ve sünger parenkiması olmak üzere iki sıralıdır. Periferde silindirik, lümene bakan tarafta ise küresel hücrelerden oluşan palizat parenkiması 2-3 sıralıdır, düzenli ve hücre araları boşluksuzdur. Sünger parenkiması hücrelerinin de küresel palizat parenkiması hücreleri gibi hücrelerarası boşlukları yoktur. Sünger parenkiması, periferinde çok sayıda salgı hücresi içerir, yaprak ayasının genişlediği orta kısımlarda hücreler birbirinden kopuktur. İletim demetlerinin sayısı 7-10 tanesi ventral, 9-12 tanesi dorsal olmak üzere genellikle 16-22 adettir. Dorsaldeki iletim demetleri bir büyük bir küçük şeklinde sıralanmışlardır. Ventraldeki iletim demetleri ise nispeten küçüktür (Şekil 1; A, B, C, D).

Skapus enine kesitte hemen hemen yuvarlaktır. Epidermis dokusu dışa bakan duvarları kalınlaşmış tek sıralı hücrelerden oluşur. Dışarıdan iyi gelişmiş, üstü hafif krenat kütikula tarafından çevrelenir. Sklerenkima lifleri ve epidermis arasında 5-7 sıralı parenkima hücreleri bulunur. Sklerenkima dokusu 5-9 sıralı çeperi kalınlaşmış yuvarlak hücrelerden oluşur. Periferde yer alan hücreler daha küçük ve hücre duvarları daha kalınken lümendeki hücreler daha büyük ve duvarları daha incedir. Bu hücrelerin bazılarında nişasta taneleri net bir şekilde gözlemlenebilir. İletim demetleri sklerenkima dokusunun dışa ve içe bakan tarafında olmak üzere iki halka üzerinde sıralanmıştır. Periferdeki halkada aynı boyutlarda 12-16 adet iletim demeti bulunur. Bunlar iç halkadakilere nazaran küçüktür. İç tarafta dış halkadakilere daha büyük ve kendi içlerinde aynı üç adet iletim demeti bulunur (Şekil 1; E, F).

Brullo ve ark. (1997) Yunanistan'da yayılış gösteren *A. karistanum* Brullo, Pavone & Salmeri türünü bilim dünyasına tanıttığı yayında *A. callidiction* ve *A. peroninianum* türlerinin yaprak anatomisi bakımından *A. greuteri* Brullo & Pavone, *A. pentadactyli* Brullo, Pavone & Spamp ve *A. karistanum* türlerine benzediğini ortaya koymuştur. *A. karistanum* türünün yaprak enine kesiti *A. callidiction* ve *A. peroninianum* türlerinde olduğu gibi böbrek şeklindedir. Epidermis tabakası iyi gelişmiş bir kütikula ile çevrelenmiştir. Dış yüzey tüylerle kaplıdır. Palizat parenkiması iki sıralı ve düzenli bir şekilde dizilmiş hücrelerden oluşmaktadır. Sünger parenkiması hücreleri ise oldukça yoğun, orta kısımda palizat parenkimasına uzak kısımlarda nispeten büyüktür. Sünger parenkiması periferinde çok sayıda salgı kanalı bulunmaktadır. İletim demetlerinin sayısı; 6 tanesi dorsal, 4 tanesi ventralde olmak üzere 10 tanedir [27]. Bu çalışmada, gözlemlenen farklılıklar şöyledir. *A. peroninianum* ve *A. callidiction* türlerinin yaprak anatomileri incelendiğinde epidermisin dışa bakan duvarı kalınlaşmış ve yüzeyi hafifçe

dentikulat bir kütikula ile çevrelenmiştir. İletim demetlerinin sayısı 9-12 tanesi dorsal, 7-10 tanesi ventralde olmak üzere 16-22 tanedir (Şekil 1; A, B, C, D).



Şekil 1. *Allium callidiction* yaprak ve skapus anatomisi. A, B, C, D yaprak enine kesiti, E, F skapus enine kesiti. (K) kütikula, (ÖT) örtü tüyü, (E) epidermis, (S) stoma, (PP) palizat parenkiması, (SH) salgı hücresi (İD) iletim demeti, (X) ksilem, (F) floem, (SP) sünger parenkiması, (YB) yaprak boşluğu, (GB) gövde boşluğu (İnceleme Ortamı: Sartur)

***Allium peroninianum* Azn.**

Lektotip: TÜRKİYE. [Turkey, İstanbul] endroits rocheux de Yacadjik-Dagh [Yakacık Dağı], 20 viii 1893, Aznavour 2202 (G00165023!).

Çiçeklenme: Haziran-Ağustos. **Fitocoğrafik Bölge:** İran-Turan elementi. **Yayılış ve Habitat:** Endemik bir tür olan *Allium peroninianum* Orta, Kuzey ve Güney Anadolu Bölgelerinde 400–3000 m arası yüksekliklerde doğal yayılış göstermektedir. **Taksonomik not:** *A. peroninianum* türünün

morfolojik olarak en yakın olduğu tür *A. callidictyon* türüdür. Bu türden üçgen-dar filament tabanı, tek tarafa meyilli umbellası ve yayılış alanı bakımından kolaylıkla ayrılmaktadır [26].

Yaprak enine kesiti böbrek şeklindedir. Epidermisin dışa bakan duvarı kalınlaşmış ve dışarıdan iyi gelişmiş, yüzeyde hafifçe krenulat bir kütikula ile çevrelenmiştir. Dağınık halde bulunan stomalar tüm yaprak yüzeyini kaplar. Parenkimatik doku palizat parenkiması ve sünger parenkiması olmak üzere iki sıralıdır. Periferde silindirik, lümene bakan tarafta ise küresel hücrelerden oluşan palizat parenkiması periferdeki ilk iki sıra nispeten büyük olmak kaydıyla 2-3 sıralı, düzenli ve hücre araları boşluksuzdur. Sünger parenkiması hücreleri küreseldir ve de palizat parenkiması hücreleri gibi boşluksuzdur. Sünger parenkiması, periferinde çok sayıda salgı hücresi içerir. İletim demetlerinin sayısı 9-10 tanesi dorsal, 7-10 tanesi ventralde olmak üzere genellikle 16-20 adettir. Dorsal iletim demetleri bir büyük bir küçük şeklinde sıralanmışlardır. Ventraldeki iletim demetleri küçüktür (Şekil 2; A, B, C, D).

Skapus enine kesitte hemen hemen yuvarlaktır. Epidermis dokusu dışa bakan duvarları kalınlaşmış tek sıralı hücrelerden oluşur. Dışarıdan iyi gelişmiş, üst kısımda hafif dentikulat bir kütikula tarafından çevrelenir. Sklerenkima lifleri ve epidermis arasında 2-3 sıralı parenkima bulunur. Sklerenkima dokusu 7-11 sıralı, yuvarlak hücrelerden oluşur. Periferde hücreler daha küçük ve çeperleri daha kalınken lümendeki hücreler daha büyük ve duvarları daha incedir. Bu hücrelerin bazılarında nişasta taneleri net bir şekilde gözlenebilir. İletim demetleri, sklerenkima dokusunun dışa ve içe bakan tarafında olmak üzere iki halka üzerinde sıralanmıştır. Periferdeki halkada yaklaşık olarak aynı boyutlarda 14-18 adet iletim demeti bulunur. İç tarafta dış halkadakilerden daha büyük ve kendi içlerinde aynı dört adet iletim demeti bulunur. Anatomik olarak *A. peroninianum* ve *A. callidictyon* scapusları benzer görünüme sahiptir (Şekil 2; E, F).

Allium hirtovaginatum Kunth

Lektotip: TÜRKİYE. [İzmir] Asia mineure, Tchesmé (Çeşme), no date, G.A. Olivier & J.G. Bruguère s.n. (P00747843!).

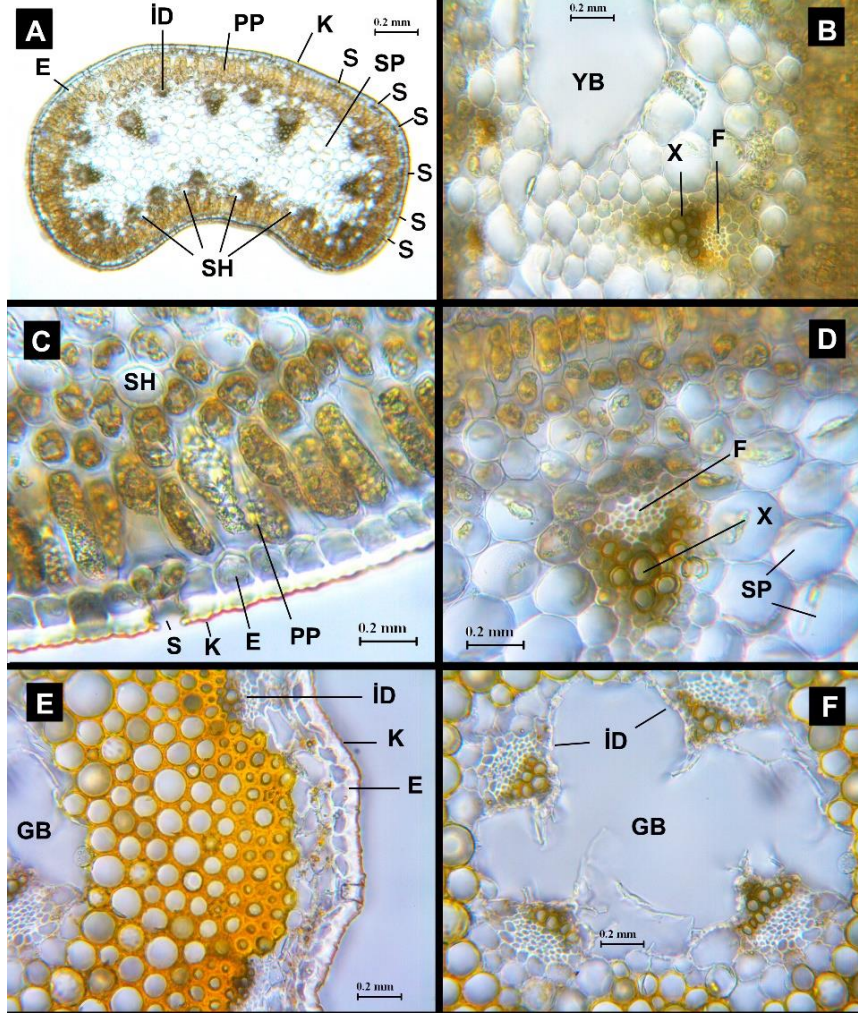
Sinonim: *A. cupani* subsp. *hirtovaginatum* (Kunth) Stearn

Çiçeklenme: Haziran-Ağustos. **Fitocoğrafik Bölge:** Akdeniz elementi. **Yayılış ve Habitat:** Batı Anadolu ve Ege Adaları'nda 0-350(-700) m yükseklikleri arasında doğal yayılış göstermektedir.

Taksonomik not: *A. hirtovaginatum* türü taksonomik olarak *A. cupani* Raf. türü ile benzerlik gösterir. Ancak *A. hirtovaginatum* türünde spatanın umbelladan uzun olması bu iki yakın türü birbirlerinden kesin bir şekilde ayırmaktadır.

Yaprak enine kesiti böbrek şeklindedir. Epidermisi meydana getiren tek sıra halinde dizilmiş hücreler ve dışarıdan iyi gelişmiş bir kütikula ile çevrelenmiştir. Dağınık halde bulunan stomalar tüm yaprak yüzeyini kaplar. Palizat parenkiması hücreleri tek sıralı, düzenli, silindirik ve hücrelerarası boşluksuzdur. Sünger parenkiması hücreleri ise küreseldir ve palizat parenkiması hücrelerinde olduğu gibi hücrelerarası boşluksuzdur. Sünger parenkiması periferinde çok sayıda salgı hücresi bulunur. İletim

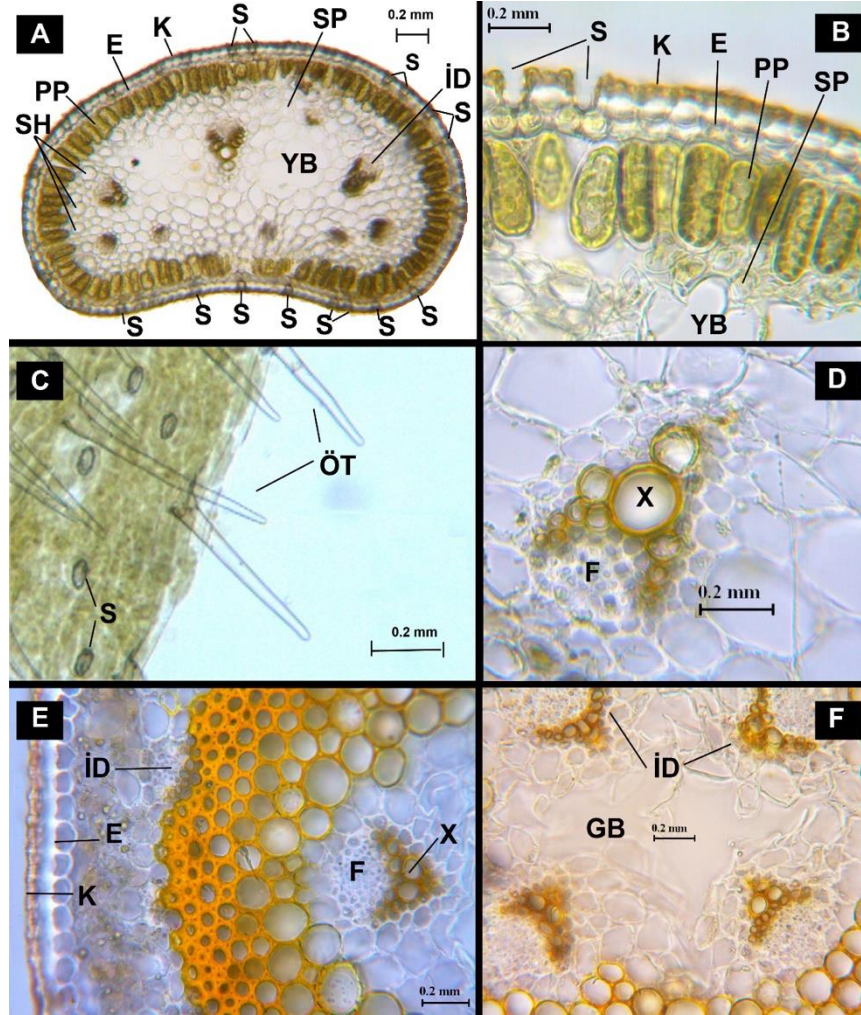
demetleri 3-5 tane ventral, 5 tanesi dorsal olmak üzere genellikle 8-10 adettir. Dorsaldeki iletim demetleri orta kısma büyük iletim demeti denk gelecek şekilde bir büyük bir küçük olarak sıralanmışlardır. Ventraldeki iletim demetleri nispeten küçüktür (Şekil 3; A, B, C, D).



Şekil 2. *Allium peroninianum* yaprak ve skapus anatomisi. A, B, C, D yaprak enine kesiti, E, F skapus enine kesiti. (K) kütikula, (S) stoma, (E) epidermis, (İD) iletim demeti, (X) ksilem, (F) floem, (SH) salgı hücresi (PP) palizat parenkiması, (SH) salgı hücresi, (SP) sünger parenkiması, (YB) yaprak boşluğu, (GB) gövde boşluğu (İnceleme Ortamı: Sartur)

Skapus enine kesitte yuvarlaktır. Epidermis dokusu dışa bakan duvarları kalınlaşmış tek sıralı hücrelerden oluşur. Dışarıdan iyi gelişmiş, üst yüzeyi hafif dentikulat bir kütikula tarafından çevrelenir. Sklerenkima hücreleri ve epidermis arasında 4-5 sıralı parenkima hücreleri bulunur. Sklerenkima dokusu 7-9 sıralı, yuvarlak hücrelerden oluşur. Periferal kortekste yer alan hücreler daha küçük ve çeperleri daha kalınken skapus boşluğuna bakan hücreler daha büyük ve duvarları daha incedir. Bu

hücrelerin bazılarında nişasta taneleri net bir şekilde gözlenebilir. İletim demetleri sklerenkima dokusunun dışa ve içe bakan tarafında olmak üzere iki halka üzerinde sıralanmıştır. Periferdeki halkada aynı boyutlarda 10-14 adet iletim demeti bulunur. Bunlar iç halkadakilere kıyasla küçüktür. Ventrale yakın halkada dış halkadakilere göre büyük 4 adet iletim demeti bulunur (Şekil 3; E, F).



Şekil 3. *Allium hirtovaginatatum* yaprak ve skapus anatomisi. A, B, D yaprak enine kesiti, C Yaprak Yüzeysel Kesit, E, F skapus enine kesiti. (K) kütikula, (ÖT) örtü tüyü, (E) epidermis, (S) stoma, (PP) palizat parenkiması, (SH) salgı hücresi, (İD) iletim demeti, (X) ksilem, (F) floem, (SP) sünger parenkiması (GB) gövde boşluğu, (YB) yaprak boşluğu (İnceleme Ortamı: Sartur)

Pavone (2015) Yunanistan'da yayılış gösteren *A. greuteri* Pavone türünün yaprak anatomisi bakımından *A. hirtovaginatatum* türüne benzediğini ortaya koymuştur. Bu yayında *A. greuteri* türünün epidermis tabakası *A. hirtovaginatatum* türünde olduğu iyi gelişmiş bir kütikula ile çevrelenmiştir. Palizat doku tek sıralı palizat parenkiması hücrelerinden oluşmaktadır. Sünger dokusu hücreleri ise oldukça

yoğundur, orta kısımdakiler palizat parenkimasına uzak kısımlardakilere kıyasla büyüktür. Sünger doku periferinde çok sayıda salgı kanalı bulunmaktadır. İletim demetlerinin sayısı 3 tanesi dorsal, 2 tanesi ventralde olmak üzere 5 tanedir [28] Yaptığımız çalışmada, gözlemlenen farklar ise şöyledir: *A. hirtovaginatium* yaprak kesitine bakıldığında yaprak enine kesitinin böbrek şeklinde olduğu görülmüştür. Dış yüzey tüylerle kaplıdır. Sünger parenkiması yaprak ayasının genişlediği kısımlarda boşlukludur. İletim demetleri 3-5 tane ventral, 5 tanesi dorsal olmak üzere genellikle 8-10 adettir (Şekil 3. E, F).

A. callidiction ve *A. peroninianum* türlerinde spatanın iki parçalı oluşu bu türleri spatası tek parça olan *A. hirtovaginatium* türünden net bir şekilde ayırmaktadır. Anatomik sonuçlar da morfolojik farklılıkları desteklemektedir. *A. callidiction*, *A. peroninianum* ve *A. hirtovaginatium* türleri birbirlerinden yaprak ve gövdenin ventral ve dorsalindeki iletim demetlerinin sayısı ve büyüklükleri ve parenkima hücrelerinin dizilimleri bakımından ayrılırlar. *A. callidiction* türünün yaprağında iletim demetlerinin sayısı 9-12 tanesi dorsalde, 7-10 tanesi ventralde olmak üzere 16-22 adet, *A. peroninianum* türünde 9-10 tanesi dorsalde, 7-10 tanesi ventralde olmak üzere 16-20 adet ve *A. hirtovaginatium* türünde ise 3-5 tanesi ventralde, 5 tanesi dorsalde olmak üzere genellikle 8-10 adettir. Skapus enine kesitinde iletim demetlerinin sayısı *A. callidiction* türünde periferde 12-16 tane, ventralde üç tane, *A. peroninianum* türünde periferde 14-18 tane, ventralde dört tane ve *A. hirtovaginatium* türünde ise periferde 10-14 adet, ventralde dört adettir. Benzer şekilde üç tür palizat parenkiması ve sklerenkima hücre dizilimlerinin sayıları bakımından da ayrışmaktadırlar (Tablo 2). Bu çalışmada, Türkiye’de *Cupanoscordum* seksiyonuna ait doğal yayılış gösteren ve yüksek oranda polimorfik üç türün gövde ve yaprak anatomileri karşılaştırmalı olarak incelenmiş, incelenen türlerin Akdeniz havzasında yayılış gösteren yakın türler ile benzerlikleri tartışılmıştır. Sonuç olarak, cinsin ve seksiyonun taksonomisine katkı sağlayacak belirgin anatomik farklılıklar tespit edilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. *A. callidiction*, *A. peroninianum* ve *A. hirtovaginatium* türlerinin temel anatomik farkları

		<i>A. callidiction</i>	<i>A. peroninianum</i>	<i>A. hirtovaginatium</i>
Yaprak	Dorsalde iletim demeti sayısı	9-12 adet	9-10 adet	5 adet
	Ventralde iletim demeti sayısı	7-10 adet	7-10 adet	3-5 adet
	Palizat parenkiması	2-3 sıralı	2-3 sıralı	tek sıralı
Gövde	Periferde iletim demeti sayısı	12-16 adet	14-18 adet	10-14 adet
	Lümeninde iletim demeti sayısı	3 adet	4 adet	4 adet
	Parenkima hücreleri	5-7 sıralı	2-3 sıralı	4-5 sıralı
	Sklerenkima hücreleri	5-9 sıralı	7-11 sıralı	7-9 sıralı

YAZAR KATKILARI

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

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Govaerts, R., Kington, S., Friesen, N., Fritsch, R., Snijman, D.A., Marcucci, R., Silverstone-Sopkin, P. A., Brullo, S. (2018). World checklist of Amaryllidaceae. Retrieved June 20, 2020, from <http://wccsp.science.kew.org>
2. Stearn, W.T. (1978). European species of *Allium* and allied genera of Alliaceae: a synonymic enumeration. *Annales Musei Goulandris*, 4, 83-198. <http://kdb.kew.org/kdb/detailedresult.do?id=55010>
3. Hanelt, P. (1990). Taxonomy, evolution, and history. In: H. D. Rabinowitch and J. L. Brewster (Eds.), *Onions and allied crops* (pp. 1–26). CRC Press.
4. Fritsch, R.M., Friesen, N. (2002). Evolution, domestication and taxonomy. In: H. D. Rabinowitch and L. Currah (Eds.), *Allium crop science: recent advances* (pp. 5–30). Wallingford: CABI Publishing. <https://doi.org/10.1079/9780851995106.0005>
5. Friesen, N., Fritsch, R., Blattner, F. (2006). Phylogeny and New Intrageneric Classification of *Allium* (Alliaceae) Based on Nuclear Ribosomal DNA ITS Sequences. *Aliso*, 22(1), 372–395. <https://doi.org/10.5642/aliso.20062201.31>
6. Ekşi, G., Koyuncu, M., Özkan, A.M.G. (2016). *Allium ekimianum*: A new species (Amaryllidaceae) from Turkey. *PhytoKeys*, 62(1), 83–93. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.62.7796>
7. Ekşi, G., Duman, H. (2020). *Allium shahinii*: A new species of A. sect. *Scorodon* (Amaryllidaceae) from Turkey. *Phytotaxa*, 461(3), 195–203. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.461.3.6>
8. Ekşi, G., Gençler Özkan, A.M., Koyuncu, M. (2020). Garlic and onions: An eastern tale. *Journal of Ethnopharmacology*, 253, 112675. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112675>
9. Fırat, M., Koyuncu, M., Ekşi, G. (2018). *Allium pervariensis*, sect. *Allium* (Amaryllidaceae), a

- new species from Siirt Turkey. *Plant Biosystems*, 152(3), 305–310. <https://doi.org/10.1080/11263504.2016.1271051>
10. Ekşi, G., Yıldırım, H. (2019). *Allium yamadagensis* (Amaryllidaceae) a new species from Turkey. *Phytotaxa*, 400(1), 31. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.400.1.4>
 11. Ekşi, G., Koyuncu, M., Bona, M. (2015). *Allium phaneranthum* subsp. *involucratum* (Amaryllidaceae), a new subspecies from turkey. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*, 22(2), 143–146. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3329/bjpt.v22i2.26076>
 12. Duman, H., Ekşi, G., Özbek, F. (2017). Two new species of *Allium* L. sect. *Allium* (Amaryllidaceae) from Turkey. *Plant Systematics and Evolution*, 303(9), 1271–1291. <https://doi.org/10.1007/s00606-017-1437-4>
 13. Eiaz, L., Woon, G., Eiaz, A. (2003). *Allium* vegetables and stomach cancer risk in China. *Experimental Oncology*, 23, 93.
 14. Nouroz, F., Mehboob, M., Noreen, S., Zaidi, F., Mobin, T. (2015). A Review on Anticancer Activities of Garlic (*Allium sativum* L.). *Middle-East Journal of Scientific Research*, 23(6), 1145–1151. <https://doi.org/10.5829/idosi.mejsr.2015.23.06.9381>
 15. Block, E., Ahmad, S., Jain, M.K., Crecely, R.W., Apitz-Castro, R., Cruz, M.R. (1984). The chemistry of alkyl thiosulfate esters. 8. (E,Z)-Ajoene: a potent antithrombotic agent from garlic. *Journal of the American Chemical Society*, 106(26), 8295–8296. <https://doi.org/10.1021/ja00338a049>
 16. Apitz-Castro, R., Escalante, J., Vargas, R., Jain, M.K. (1986). Ajoene, the antiplatelet principle of garlic, synergistically potentiates the antiaggregatory action of prostacyclin, forskolin, indomethacin and dipyridamole on human platelets. *Thrombosis Research*, 42(3), 303–311. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(86\)90259-8](https://doi.org/10.1016/0049-3848(86)90259-8)
 17. Beretz, A., Cazenave, J.P. (1991). Old and New Natural Products as the Source of Modern Antithrombotic Drugs. *Planta Medica*, 57(7), S68–S72. <https://doi.org/10.1055/s-2006-960232>
 18. Ali, M., Thomson, M., Afzal, M. (2000). Garlic and onions: Their effect on eicosanoid metabolism and its clinical relevance. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 62(2), 55-73. <https://doi.org/10.1054/plf.1999.0124>
 19. Thomson, M., Ali, M. (2005). Garlic [*Allium sativum*]: A Review of its Potential Use as an Anti-Cancer Agent. *Current Cancer Drug Targets*, 3(1), 67–81. <https://doi.org/10.2174/1568009033333736>
 20. Benkeblia, N. (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT - Food Science and Technology*, 37(2), 263–268. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.09.001>
 21. Ariga, T., Seki, T. (2006). Antithrombotic and anticancer effects of garlic-derived sulfur compounds: A review. *BioFactors*, 26(2), 93-103. <https://doi.org/10.1002/biof.5520260201>
 22. Pyun, M.S., Shin, S. (2006). Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against Trichophyton species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine*, 13(6), 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.03.011>

23. Godevac, D., Vujisić, L., Mojović, M., Ignjatović, A., Spasojević, I., Vajs, V. (2008). Evaluation of antioxidant capacity of *Allium ursinum* L. volatile oil and its effect on membrane fluidity. *Food Chemistry*, 107(4), 1692–1700. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.017>
24. Daka, D. (2011). Antibacterial effect of garlic (*Allium sativum*) on *Staphylococcus aureus*: An in vitro study. *African Journal of Biotechnology*, 10(4), 666–669. <https://doi.org/10.5897/AJB09.553>
25. Cheschmejiyev, J.V. (1975). Cytotaxonomic studies of several species of onion from section *Codonoprasum* Reichenb. *Doklady Akademii Nauk*, 28, 795–798.
26. Kollmann, F. (1984). *Allium* L. In: P. H. Davis (Ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol 8* (pp. 98–211). Edinburgh: Edinburgh Univ. Press.
27. Brullo, S., Pavone, P., Salmeri, C. (1997). *Allium karistanum* (Liliaceae), a new species from Evvia (Greece). *Bocconeia*, 5, 759–764.
28. Pavone, P. (2015). *Allium greuteri* sp . nova (Liliaceae) from Cyrenaica and its relationships with the *Allium cupanii* group. *Willdenowia*, 13, 115–122.



STUDY OF THE STRUCTURE OF PRODUCTS OF INTERACTION BETWEEN SOME NAPHTHOQUINONE DERIVATIVES AND PHARMACEUTICAL SUBSTANCES

*BAZI NAFTOKİNON TÜREVLERİ İLE İLAÇ MADDELERİ ARASINDAKİ ETKİLEŞİM
ÜRÜNLERİNİN YAPISININ İNCELENMESİ*

Anastasiia DONCHENKO^{1,*} , Katerina MIEDVIEDIEVA¹ ,
Oleksii VOSKOBOINIK² , Svitlana VASYUK¹ , Serhii KOVALENKO² 

¹Zaporizhzhia State Medical University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry,
69035, Zaporizhzhia, Ukraine

²Zaporizhzhia State Medical University, Faculty of Pharmacy, Department of Organic and Bioorganic
Chemistry, 69035, Zaporizhzhia, Ukraine

ABSTRACT

Objective: *The purpose of the present work is to detail a study of the interaction between naphthoquinone-based analytical reagents and such pharmacologically active ingredients as acetylcysteine, β -alanine and taurine (2-aminoethanesulfonic acid) including the isolation and structure elucidation of the formed products.*

Material and Method: *UV-visible spectrophotometry was applied to determine the stoichiometric coefficients of reactants in reactions between the pharmaceutical substances and naphthoquinone derivatives. ¹H NMR-spectroscopy, IR spectroscopy, chromatomass-spectrometry were used to prove the structure of the reaction products.*

Result and Discussion: *The stoichiometric relationships of the reactants in the investigated medicinal substances reactions with quinone derivatives were determined by the methods of saturation and continuous changes. They are 1:1 in each case. According to the determined relationships of components reaction and optimal conditions for reactions path, the products of interaction of acetylcysteine with 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone and taurine, β -alanine with sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate were isolated and identified. In order to establish the structure of the compounds, the ¹H NMR-spectroscopy, IR spectroscopy, chromatomass-spectrometry were used.*

Keywords: *Acetylcysteine, β -alanine, taurine, naphthoquinone derivatives, reaction products*

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Anastasiia Donchenko
e-mail / e-posta: donchenko130791@gmail.com, **Phone / Tel.:** +380978520282

ÖZ

Amaç: Naftokinon esaslı analitik reaktiflerin asetilsistein, β -alanin ve taurin (2-aminoetanosülfonik asit) gibi farmasötik açıdan aktif maddelerle etkilişimin, oluşan ürünlerin ayırımı yapı oluşumu dahil olmak üzere detaylı incelemesidir.

Gereç ve Yöntem: Farmasötik maddeler ile naftokinon türevleri arasındaki reaksiyonlarda reaktanların stokiyo-metrik katsayılarını belirlemek için UV - Vis spektrofotometri yöntemi uygulandı. Reaksiyon ürünlerinin yapısını kanıtlamak için 1H NMR-spektroskopi, IR spektroskopi, kütle spektrometrisi kullanıldı.

Sonuç ve Tartışma: Kinon türevleri ile araştırılan tıbbi maddelerin reaksiyonlarında reaktanların stokiyo-metrik ilişkileri, doyurma ve sürekli değişim yöntemleri ile belirlenmiştir. İlişki her durumda 1: 1'dir. Bileşen reaksiyonu ve reaksiyon yolu için optimal koşulların belirlenen ilişkilerine göre, asetilsisteinin 2,3-dikloro-1,4-naftokinon ve taurin ile, β -alanin ile sodyum 1,2-naftokinon-4-sülfonat ile etkileşim ürünleri izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Bileşiklerin yapısını oluşturmak için 1H NMR-spektroskopi, IR spektroskopisi, kütle spektrometrisi kullanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Asetilsistein, β -alanin, taurin, naftokinon türevleri, reaksiyon ürünleri

INTRODUCTION

Naphthoquinones are known as high reactive compounds, that intensively studied as promising bioactive agents [1, 2], mediators in oxidation processes [3] and dyes [4]. Lately, the abovementioned compounds repeatedly described as reagents used for the colorimetric quantitative determination of various pharmacologically active ingredients and biologically significant compounds. Among substituted naphthoquinones dichlone (2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone) and 1,2-naphthoquinone-4-sulphonic acid sodium salt proved to be the most widely used colorizing reagents. Thus, dichlone was proposed as an effective reagent for quantitative determination of primary amines [5]. The spectrophotometric estimation of piperazine in dosage forms using dichlone and acetaldehyde as reagents was described as one of the possible modifications of elaborated before analytical methods [6]. Charge-transfer reaction of 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone with crizotinib was used for development of microwell assay for its quantitative determination in capsules [7]. Authors substantiated the nature of the abovementioned reaction products by computation approaches [8]. Also, 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone found to be an effective colorizing reagent for spectrophotometric determination of isoniazid in presence of its hydrazones.

Data related to the application of 1,2-naphthoquinone-4-sulphonic acid sodium salt for the spectrophotometric quantitative determination of amino-group containing pharmaceuticals in various objects were generalized and critically evaluated in the comprehensive review by Elbashir A.A. et al [9]. It was shown that usage of 1,2-naphthoquinone-4-sulphonic acid sodium salt was reasonable for quantitative determination of analytes as in dosage forms so in biological material (urine and plasma). The authors also summarized the information about optimal conditions of derivatization processes.

After publication of the abovementioned review 1,2-naphthoquinone-4-sulphonic acid sodium salt was described as valued colorizing reagents for spectrophotometric determination of cefotaxime [10] and other cephalosporins [11], finasteride [12], folic acid [13], rimantadine and memantine [14]

etc. 1,2-Naphthoquinone-4-sulphonate reagent also may be used for continuous-flow spectrophotometric determination of amino acids [15]. Some methods of pharmacologically active ingredients quantification require the usage of 1,2-naphthoquinone-4-sulphonic acid sodium salt together with the auxiliary reagent. Thus, application of tetradecylbenzyltrimethylammonium chloride for sensitivity improvement of spectrophotometric determination of dopamine hydrochloride using sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate as chromogenic reagent was studied [16]. The method of isoniazid spectrophotometric quantification using combination of 1,2-naphthoquinone-4-sulphonic acid sodium salt and cetyltrimethyl ammonium bromide as colorizing reagents was elaborated as well [17]. It should be noted that despite the wide usage of naphthoquinone derivatives as colorizing reagents the nature of products formed by the interaction of abovementioned compounds and analytes is a controversial issue. Some of the authors made assumptions about structure of the products of interactions between naphthoquinone colorizing reagents and analytes. As usual, their suppositions were based on data about stoichiometric coefficients of reactants, described chemical modification of naphthoquinone derivatives [4, 18] and computation approaches [19]. However, structures of the major and minor products formed in conditions of quantitative determination were not evaluated using appropriate physicochemical methods. Obviously understanding of the nature of processes that take place during the analytical reaction and structure of the products are essential for the improving of quantifying methods.

The present work was aimed at the detailed study of interaction between naphthoquinone-based analytical reagents and such pharmacologically active ingredients as acetylcysteine, β -alanine and taurine (2-aminoethanesulfonic acid) [20, 21] including the isolation and structure elucidation of the formed products.

MATERIAL AND METHOD

Reagents and chemicals

Analytical grade chemicals: 2,3-Dichloro-1,4-naphthoquinone, sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate, sodium hydroxide, DMF, 2-propanol, 1,4-dioxane, ethanol and HPLC grade solvents: acetonitrile and water were obtained from commercial sources. The reference standards of acetylcysteine, taurine and β -alanine at 99,9 % purity were provided by the chemical pharmaceutical enterprises (Ukraine).

Instrumentation

Analytic Jena UV-visible spectrophotometer model Specord 200 with 1 cm matched quartz cells were used for UV-Vis studies. Kern electronic scales ABT-120-5DM was used measuring of the weight. Water bath Memmert WNB 7-45 was used for heating of reaction mixtures.

IR spectra (4000–600 cm^{-1}) were recorded on a Bruker ALPHA FT-IR spectrometer using a module ATR eco ZnSe. ^1H NMR spectra (400 MHz) were recorded on a Varian-Mercury 400 (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) spectrometers with TMS as internal standard in DMSO- d_6 solution.

Mass spectra were recorded on a high performance liquid chromatograph «Agilent 1100 Series» (Agilent, Palo Alto, CA, USA) equipped with DAD, ELSD and MSD «Agilent LC/MSD SL».

Chromatographic conditions

Column «Zorbax SB-C18» —1.8 μm , 4.6 mm x 15 mm. Eluent: A — CH_3CN — H_2O (95:5), 0.1 % HCOOH , B — H_2O (0.1 % HCOOH). Gradient: 0 min – 0% A, 0.01 min – 0% A, 1.5 min – 100% A, 1.7 min – 100% A, 1.71 min – 0% A. The injection volume 1.0 μL . The column temperature: 40 $^\circ\text{C}$. DAD: 215, 254 nm.

Mass-spectrometry conditions

Ion Source: API-ES. Scan. Mass Range: m/z 70-600. Fragmentor voltage: 100V. Positive and negative polarity.

Procedure for interaction of acetylcysteine with 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone

To the solution of 0.66 g (4 mmol) of acetylcysteine in 10 ml of (DMF) solution of 0.91 g (mmol) of 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone in 10 ml of DMF was added. The formed mixture was shaken and heated on a water bath within 30 min at the 95 $^\circ\text{C}$. Then the reaction mixture was cooled and poured into the purified water. For ^1H NMR analysis compound **3** was recrystallized from 2-propanol. The isolated product of the reaction is yellow-brown crystals soluble in DMF, acetonitrile, 1,4-dioxane, slightly soluble in water, ethanol, 2-propanol. The yield of the obtained chemical compound is 1.0 g.

2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone (1) IR (cm^{-1}): 1678, 1530, 950, 985; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 8.20-8.01 (m, 2H, naphthalene H-5,8), 7.97-7.76 (m, 2H, naphthalene H-6,7); LC-MS (APCI): $m/z= 227$

Acetylcysteine (2) IR (cm^{-1}): 3300, 2550, 1712, 1680, 1530, 950, 985; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 12.71 (s, 1H, COOH), 8.16 (d, 1H, NH) 4.37 (td, 1H, CH) 2.90-2.79 (m, 1H, CH_2), 2.76-2.62 (m, 1H, CH_2), 2.41 (bs, 1H, SH), 1.87 (s, 3H, CH_3); LC-MS (APCI): $m/z= 164$.

N-acetyl-S-(3-chloro-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)cysteine (3). IR (cm^{-1}): 1679, 1662, 1557, 910, 1273, 1137, 820, 705, 639; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 8.34 (d, 1H, NH), 8.06-7.97 (m, 2H, naphthalene H-5,8), 7.88-7.85 (m, 2H, naphthalene H-6,7), 4.57-4.45 (m, 1H, CH), 3.91-3.75 (m, 1H, CH_2), 3.55-3.43 (m, 1H, CH_2), 1.69 (s, 3H, CH_3); LC-MS (APCI): $m/z= 354$

Procedure for interaction of taurine with sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate

To the solution of 3.1 g of taurine (25 mmol) in 50 ml of purified water solution of 6.5 g (25 mmol) of sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate in 50 ml of purified water was added. A mixture was shaken, then 1.0 g of crystalline NaOH was added. The reaction mixture was heated on a water bath

during 5 min at 95°C. The obtained mixture was cooled. The solvent was removed under vacuum using rotary evaporator. Yield of the obtained compound is 8.0 g (75.47%).

Procedure for interaction of β -alanine with sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate

To the solution of 2.23 g of β -alanine (25 mmol) in 50 ml of purified water solution of 6.5 g (25 mmol) of sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate in 50 ml of purified water was added. A mixture was shaken, then 1.0 g of crystalline NaOH was added. The reaction mixture was heated on a water bath during 10 min at 60°C. The obtained mixture was cooled. The solvent was removed under vacuum using rotary evaporator. The yield of the obtained product is 8.6 g.

LC-MS (APCI): compound **7**: tR = 0.834 min, m/z = 282; compound **8**: tR = 0.766 min, m/z = 246; compound **9**: tR = 1.077 min, m/z = 389; compound **10**: tR = 0.991 min, m/z = 317; compound **11**: tR = 0.678 min, m/z =563; compound **12**: tR = 0.871 min, m/z =491.

RESULT AND DISCUSSION

Determination of stoichiometric coefficients of reactants in reactions

In order to determine the stoichiometric coefficients of reactants in reactions between the selected pharmaceutical substances and some naphthoquinone derivatives, the most common methods were used: method of continuous changes (method of isomolar series) and saturation method (method of molar ratios). Method of continuous changes is based on the determination of relations of isomolar concentrations of reacting substances, which corresponds to the maximum yield of the product formed. We cite the principle of determination of stoichiometric coefficients between taurine and sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate as an example. For carrying out the chemical analysis, solutions of the reagent and the pharmaceutical substance under study of the same molar concentration (0.005 M) were prepared and mixed in inverse ratios (from 1:9 to 9:1), leaving the total volume of the solution unchanged. The reaction was carried out in accordance with the methodology developed. Absorption of the solutions formed was measured at the selected analytic wavelength. A diagram of dependence of the absorption on the relation between the volumes of components of isomolar series was constructed based on the data obtained (Figure 1).

Method of molar ratios is a widely used method of study of compounds. The principle of the method is to define the dependence on the concentration of one of the components at the steady-state concentration of another and vice versa. A break point of the curve corresponds to the ratio of stoichiometric coefficients, which is equal to the equivalent concentration of components (Figure 2).

As is clear from figures 1 and 2, stoichiometric ratios of reactants “taurine – sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate”, obtained by the methods of continuous changes and the saturation method, fully correlate with one another as the 1:1 ratio.

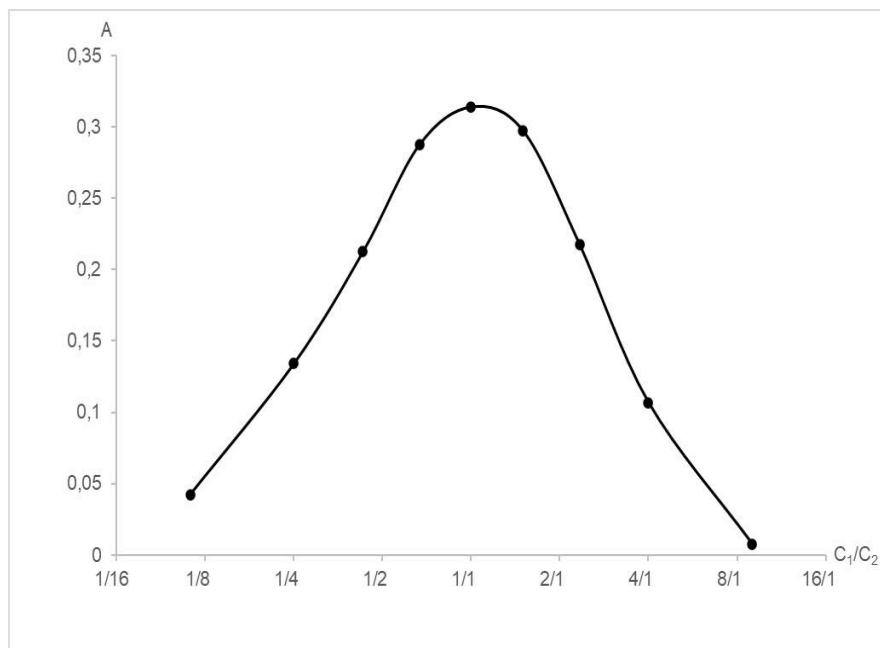


Figure 1. The graph of the absorbance values as a function of isomolar solution composition (C_1 – 0.005 M NQS solution, C_2 – 0.005 M taurine solution)

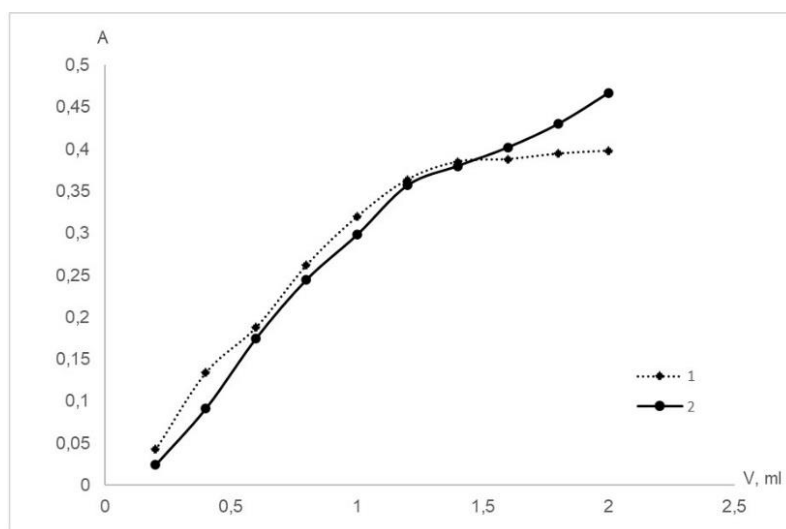


Figure 2. The saturation curves: 1 – sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate at constant concentration of taurine (1 ml 0.005 M solution); 2 – taurine at constant concentration of sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate (1 ml 0.005 M solution)

Using the results of the above-mentioned methods, we have determined stoichiometric ratios of reactants “pharmaceutical substance – reagent”, which clearly correlate with one another (Table 1).

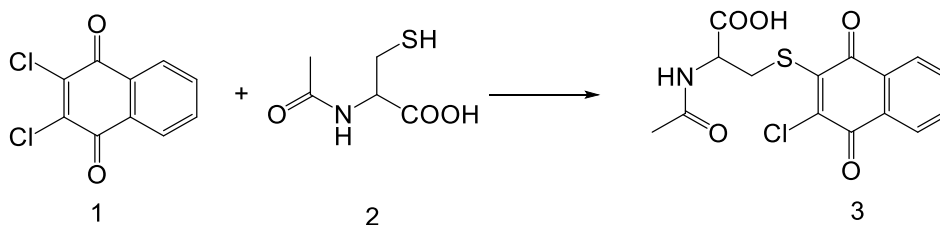
Table 1. Stoichiometric ratios of reactants «pharmaceutical substance – reagent»

Pharmaceutical substance – reagent	Methods	
	Method of isomolar series	Method of molar ratios
Acetylcysteine – 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone	1:1	1:1
Taurine – sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate	1:1	1:1
β-Alanine – sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate	1:1	1:1

Isolation and structural elucidation of products of interaction between the investigative pharmaceutical substances and naphthoquinone derivatives

Colored product of interaction of acetylcysteine with 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone was isolated and identified using LC-MS and ¹H NMR methods. LC-MS spectra showed that interaction between abovementioned reagents resulted single product with $m/z = 227$.

¹H NMR-spectroscopy was used for confirmation of the structure of the formed products of the reaction. Comparing of characteristic protons chemical shifts in ¹H NMR spectra of acetylcysteine (**2**), 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone (**1**) and product (**3**) as well as LC-MS data analysis allowed to identify a product as *N*-acetyl-*S*-(3-chloro-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalene-2-yl)cysteine. Thus, nucleophilic substitution of halogen in 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone by mercapto-group of acetylcysteine occurred (Figure 3).

**Figure 3.** Reaction of acetylcysteine with 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone

The following spectral characteristics confirm the structure of the above-mentioned compound **3**: the disappearance of a characteristic signal of –SH-group proton (2.41 ppm) in the spectrum; a slight paramagnetic shift (by 0.2 ppm) and a change of multiplicity (from triplet doublet to multiplet) of a classifying signal of a proton of the asymmetrical -CH-group. A singlet of the *NH*-group also has a paramagnetic shift (by 0.18 ppm), one-proton multiplet signals of the -CH₂-group at the chiral center – by 0.9-0.8 ppm, and a triple-proton singlet of a methyl group of an acyl residue - by 0.2. ppm. Adding acetylcysteine residue to 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone, as expected, causes a diamagnetic shift of aromatic protons of positions 5, 6, 7 and 8 by 0.14 ppm.

IR-spectra of the reaction product **3** additionally proved the structure of obtained compounds. Comparing of IR-spectra of the reaction product (**3**) with the spectra of acetylcysteine (**2**) and 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone (**1**) revealed that main bands of absorption of initial reagents had also been observed in the spectrum of the reaction product (**3**). However, as expected, stretching vibrations of the NH- and SH-groups in the spectrum of the compound **3** disappear at 3300 cm^{-1} and 2550 cm^{-1} , respectively. There must be a certain bathochromic shift (by $20\text{-}30\text{ cm}^{-1}$) of, stretching vibrations of the CO-group of carboxylic acids (resonates together with $\nu_{\text{C=O}}$ dichlorone at 1679 cm^{-1}) and ν_{CO} ("Amide I"). Moreover, adding a substituent with donor properties to a molecule leads to a significant reduction of the strength of stretching vibrations -C=C- bond in the aromatic system. The above-mentioned facts clearly substantiate the reaction of nucleophilic substitution between acetylcysteine and 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone and the formation of a new reaction product.

Further, the interactions of sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate(**4**) with taurine (**5**) and alanine (**6**) were studied (Figure 4). LC-MS-spectra revealed that both reactions resulted mixtures that consist of two major and traces of one minor products. Considering m/z values and literature data [18] one of the major components were identified as products of sulfo-group substitution (compound **7** or **8** with $m/z = 282$ and $m/z = 246$ correspondingly). The second major products of the reaction had the doubled relative to the compounds **7** or **8** value of m/z and probably were the dimers of abovementioned compounds. In view of the nature and position of reaction centers in molecules of compounds **7** and **8**, it was proposed that their dimers were formed as result of addition of nucleophilic amino-group to the double bond of oxo-fragment (compounds **11** and **12** with m/z values 563 and 491 respectively). We emphasize that formation of the products like compounds **11** and **12** were not previously reported. The minor products had m/z values that allowed to identify them as products of nucleophilic addition followed by elimination reaction of compounds **7**, **8** and corresponding analytes (compounds **9** and **10**). It should be noted that nature and content of the products completely agreed with evaluated stoichiometric ratios.

Summing up the above, we studied the interaction between naphthoquinone colorizing reagents and such analytes as acetylcysteine, taurine, and β -alanine. We evaluated the structure of the products of the reaction and showed that their nature corresponded to the found stoichiometric ratios. Also, we revealed the previously unknown process of products dimerization when quantifying taurine and β -alanine using sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate as colorizing reagent.

Conducted studies revealed that reaction of acetylcysteine with 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone proceeded unambiguously and yielded one product namely N-acetyl-S-(3-chloro-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)cysteine. The reaction between sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate and β -alanine (or taurine) resulted the mixture wherein product of substitution of sulfonic group by amine moiety and its dimer were identified as main component. The structures of products

were proposed according to the m/z values and nature of reactional centers in interacting molecules. The obtained information is valuable for future development of spectrophotometric methods based on the usage of naphthoquinone colorizing agents.

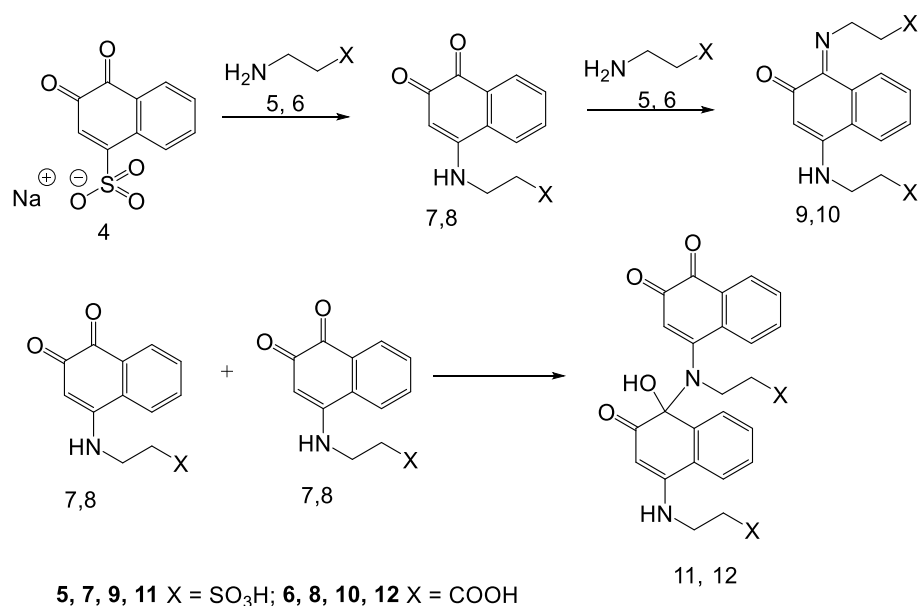


Figure 4. Reaction of sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate with taurine and β -alanine.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Pinto, A.V., Lisboa de Castro, S. (2009). The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. *Molecules*, 14(11), 4570–4590. doi:10.3390/molecules14114570
- Tandon, V.K., Kumar, S. (2013). Recent development on naphthoquinone derivatives and their therapeutic applications as anticancer agents. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 23(9), 1087–1108. doi:10.1517/13543776.2013.798303

3. Reuillard, B., Le Goff, A., Agne`s, C., Holzinger, M., Zebda, A., Gondran, C., Elouarzaki, K., Cosnier, S. (2013). High power enzymatic biofuel cell based on naphthoquinone-mediated oxidation of glucose by glucose oxidase in a carbon nanotube 3D matrix. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15, 4892-4896. doi: 10.1039/c3cp50767j
4. Ibis, C., Deniz, N.G. (2010). Synthesis and spectroscopic properties of S-,O-Substituted naphthoquinone dyes . *Phosphorus, sulfur, silicon and the related elements*, 185(11), 2324-2332. doi:10.1080/10426501003598671
5. Abou-Ouf, A., Taha, A.M., Saidhom, M. (1973). Spectrophotometric analysis of primary aliphatic amines with dichlone. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62(10), 1700-1702. doi:10.1002/jps.2600621028
6. Shishoo, C.J., Suhagia, B.N., Rathod, I.S., Thakore, S.S. (1996). Spectrophotometric estimation of piperazine in dosage forms using Dichlone and Acetaldehyde as reagents. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58(6), 219-221.
7. Alzoman, N.Z., Alshehri, J.M., Darwish, I.A., Khalil, N.Y., Abdel-Rahman, H.M. (2015). Charge–transfer reaction of 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone with crizotinib: Spectrophotometric study, computational molecular modeling and use in development of microwell assay for crizotinib. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23, 75–84. doi:10.1016/j.jsps.2014.06.003
8. Devani, M.B., Shishoo, C.J., Patel, M.A., Bhalara, D.D. (1978). Spectrophotometric Determination of Isoniazid in Presence of Its Hydrazones. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67(5), 661–663. doi:10.1002/jps.2600670523
9. Elbashir, A.A., Ahmed, A.A., Ahmed, S.M.A., Aboul-Enein, H.Y. (2012). 1,2-Naphthoquinone-4-sulphonic acid sodium salt (NQS) as an analytical reagent for the determination of pharmaceutical amine by spectrophotometry. *Applied Spectroscopy Reviews*, 47(3), 219-232. <http://dx.doi.org/10.1080/05704928.2011.639107>
10. Fan, B., Geng, M., Wang, Y., Lia, Q. (2013). Spectrophotometric Determination of Cefotaxime by Using Sodium 1,2-Naphthoquinone-4-Sulfonate. *Journal of Analytical Chemistry*, 68(11), 965–968. doi: 10.1134/S1061934813110038
11. Ahmed, S.M.A., Elbashir, A.A., Aboul-Enein, H.Y. (2015). New spectrophotometric method for determination of cephalosporins in pharmaceutical formulations. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(2), 233–239. doi:10.1016/j.arabjc.2011.08.012
12. Ahmed, S.M., Elbashir, A. A. (2015). Development and validation of spectrophotometric method for determination of finasteride in pharmaceutical formulation using 1,2-Naphthoquinone-4-sulfonate (NQS). *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, 6(3), 1000248. doi:10.4172/2155-9872.1000248
13. Al-Araji, R.R., Mashkour, M.S., Al-Mulla, E.A.J. (2017). Spectrophotometric Determination of Vitamin Folic Acid B9 in Some Drugs Using 2-Naphthoquinone-4-Sulphonate (NQS). *Nano Biomedicine and Engineering*, 9(3), 208-213. doi: 10.5101/nbe.v9i3.p208-213
14. Muszalska, I., Sobczak, A., Kiaszewicz, I., Rabiega, K., Lesniewska, M.A., Jelinska, A., (2015). 1,2-Naphthoquinone-4-sulfonic acid sodium salt as a reagent for spectrophotometric

- determination of rimantadine and memantine. *Journal of Analytical Chemistry*, 70(3), 320–327. doi:10.1134/s106193481503012015
15. Saurina, J., Hernández-Cassuo, S. (1993). Continuous-flow spectrophotometric determination of amino acids with 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate reagent. *Analytica Chimica Acta*, 283(1), 414-420. doi:10.1016/0003-2670(93)85252-f
 16. Li, Q., Li, J., Yang, Z. (2007). Study of the sensitization of tetradecyl benzyl dimethyl ammonium chloride for spectrophotometric determination of dopamine hydrochloride using sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate as the chemical derivative chromogenic reagent. *Analytica Chimica Acta*, 583, 147–152. doi: 10.1016/j.aca.2006.09.051
 17. Nagaraja, P., Srinivasa, Murthy, K.C., Yathirajan, H.S. (1996). Spectrophotometric determination of isoniazid with sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate and cetyltrimethyl ammonium bromide. *Talanta*, 43, 1075-1080. doi: 10.1016/0039-9140(95)01864-6
 18. Asahi, Y., Tanaka, M., Shinozaki, K. (1984). Reaction of 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate with aliphatic amines: Structure of the colored products and kinetics. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 32(8), 3093–3099. doi: 10.1248/cpb.32.3093
 19. Delarmelina, M., Greco, S.J., Carneiro, J.W. (2017). Single step mechanism for nucleophilic substitution of 2,3-dichloro naphthoquinone using nitrogen, oxygen and sulfur nucleophiles: A DFT approach. *Tetrahedron*, 73(30), 4363–4370. doi:10.1016/j.tet.2017.05.095
 20. Miedvedieva, K.P., Donchenko, A.O., Vasiuk, S.O. (2019). Application of quinone derivatives for spectrophotometric determination of drugs. *Current Issues in Pharmacy and Medicine: Science and Practice*, 3(31), 250-255. doi:10.14739/2409-2932.2019.3.184173
 21. Portnaya, E.P., Vasyuk, S.A. (2014). Spectrophotometric determination of taurine in dosage forms using sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 48(8), 553-557. doi: 10.1007/s11094-014-1150-3



FABRICATION OF ELECTROCHEMICAL NANOSENSOR BASED ON CuO AND GRAPHITE POWDER AND ITS APPLICATION FOR TRACE ANALYSIS OF OP (ORGANOPHOSPHORUS) PESTICIDES IN REAL SAMPLES

*CuO VE GRAFİT TOZUNA DAYALI ELEKTROKİMYASAL NANOSENSÖR İMALATI VE
GERÇEK NUMUNELERDE OP (ORGANOFOSFOR) PESTİSİTLERİNİN ESER MADDE
ANALİZİ İÇİN UYGULAMASI*

Aayushi CHANDERIYA , Ratnesh DAS* 

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

ABSTRACT

Objective: Uncomplicated, low-cost, highly discerning, and sensitive electrochemically active nanosensors have been synthesized using copper salt as a precursor, surfactants, and structural directing agents. These synthesized CuO Nanoparticles (NPs) were electroactive and EC treatments were also performed by modifying these NPs with graphite powder (CPE) to enhance the electrocatalytic activity, sensitivity.

Material and Method: The characterization of these fabricated nanosensors was done by cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV), field emission scanning electron microscopy (FESEM), powder X-ray diffraction (PXRD), transmission electron microscopy (TEM).

Result and Discussion: The EC behavior of Organophosphorus (OP) pesticides in the real samples was examined by these fabricated sensors. Parameters such as pH of solution scan rate of the experiment, accumulation time, and potential difference have been optimized in the experiment for trace determination of OP pesticides.

Keywords: Carbon paste electrode, cyclic voltametry, electrochemical sensing, nanosensor, organophosphorus pesticides

ÖZ

Amaç: Karmaşık olmayan, düşük maliyetli, son derece seçici ve hassas elektrokimyasal olarak aktif nanosensörler, bir öncü olarak bakır tuzu, yüzey aktif maddeler ve yapısal yönlendirme ajanları kullanılarak sentezlenmiştir. Sentezlenen bu CuO Nanopartiküller (NP'ler) elektroaktiftir ve elektro katalitik aktiviteyi ve hassasiyeti artırmak için grafit tozu (CPE) ile modifiye edilerek EC işlemleri de gerçekleştirilmiştir.

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Ratnes Das
e-mail / e-posta: ratnesdas1@gmail.com, **Phone / Tel.:** +917697834544

Gereç ve Yöntem: Bu fabrikasyon nano sensörlerin karakterizasyonu, dönüşümlü voltametri (CV), diferansiyel puls voltametri (DPV), alan emisyonu taramalı elektron mikroskobu (FESEM), toz X-ışın kırınımı (PXRD) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile yapılmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Organofosforlu (OP) pestisitlerin gerçek numunelerdeki EC davranışı bu fabrikasyon sensörlerle incelenmiştir. OP pestisitlerinin eser madde tespiti için çözelti tarama hızının pH'ı, birikme süresi ve potansiyel fark gibi parametreler optimize edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Karbon pasta elektrot, dönüşümlü voltametri, elektrokimyasal algılama, nanosensör, organofosfor pestisitler

INTRODUCTION

Electrochemical sensing technique is an interesting tool for the analysis of original biological samples. These Electrochemical techniques have a wide range of applications such as high sensitivity and low detection limits with rapid and concurrent analysis of many samples. All these experiments required very cheap instrumentations [1-4]. Metal-based NPs can effectively increase the sensitivity and selectivity. Metal-based NPs have unique physical and electro catalytic properties such as surface-to-volume ratio is high, they are chemically stable and their electrical conductivity is also quite good, all these qualities have made these metal-based NPs a perfect candidate for sensing applications as well as for developing the Electrochemical studies for sensing purpose [5-9].

This is the reason that we have preferred electrochemical techniques for sensing purposes. In other processes, there is the use of a large number of organic solvents, time-consuming procedures, complicated procedures, and the use of expensive instrumentation [10,11].

Organophosphorus pesticides have been utilized for pre-ripening treatment in an assortment of harvests. This pesticide undergoes degradation to generate metabolites and these metabolites are poisonous and somewhat water dissolvable. These metabolites pollute water resources as well as soil. As far as the environmental and biological systems are concerned these pesticides must be monitored. As these OP have hazardous effect on health. Materials with dimensions less than 100nm are commonly known as nanomaterials. They have a high surface area, comparatively high reactivity, and very unique mechanical and optical properties. Due to these properties, they are used in different fields such as electronics, medicine, energy device, and sensor, etc. [15].

Some of the research articles show the use of nanomaterial as a biosensor for the assessment of total antioxidant capacity in organic product juices. Biosensors show the increased performance compared to the bare electrode, as nanomaterials have a high surface area and good electrochemical properties [16].

There exists a huge demand for new technology which can improve the quality and safety of food products, Fatima Mustafa et al. described the use of nanosized particles in the food industry with sensing technologies [17].

Reports shows that AgNPs, TiO₂ NPs, and nano-encapsulates are the major nano-based material which have been used in the food industry they are mainly used as food additives and food contact materials. In a recent report, it is shown that nanoparticle-based sensors can be used for the detection of pesticides and other adulteration in food [18].

Recent research work also concludes that the Nanomaterial-based sensors showed higher sensitivity and a trustworthy technology for the detection of pesticides in fresh water in the future [19].

Garcia, et al. (2018) reviewed applications for the use of nanomaterial as a sensing element inside the packaging. They reviewed metal oxides such as TiO₂, ZnO, aluminum oxide, silicon dioxide/silica and conclude that a small amount of these materials migrate from the packaging [20].

Different techniques such as liquid and gas chromatography [21, 22], spectroscopy [23], and electrochemistry [24] have been used for forensic investigations. In this field, nanomaterial-based biosensors have become very famous because of their special properties [25].

MATERIAL AND METHOD

Preparation of stock solution of 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ OP pesticide was done in ethanol, Graphite powder, CuNO₃, KCl, buffer solution, and surfactants. All the solutions were prepared in DI water.

The Organophosphorus pesticide was used without further purification. The stock solution of OP was prepared in pure ethanol. The concentration of OP was 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, after the preparation of the solution, and it was kept in the dark at low temperature.

The composition of buffer solution: -20 mmol phosphate buffer was prepared with the help of K₂HPO₄ and its conjugate base KHPO₄. Both salts were dissolved in DI water.

Apparatus

Metrohm Autolab B.V. PGSTAT128N computer controlled with software NOVA version 1.11.2, with Conventional 3 electrode system, for this experiment Carbon paste electrode was used as a working electrode, Ag/AgCl (3 M KCl) used as a reference electrode and platinum wire as counter electrode. NOVA NANOSEM 450 FESEM equipped with EDX for SEM analysis.

Synthesis of CuO nanoparticle

CuO was prepared by using different structural agents. 1.0 g of copper salt was dissolved in 5 ml of DI water, to this 1.00 g of Tween was added followed by the addition of 2.00 g of dextran (Mw = 2×10^6 M) at room temperature. The resultant gel was heated for 30 minutes at 80°C on a magnetic stirrer to form a light blue color gel, this gel was aged for 3 to 4 days and then calcined at 600°C for 2 hours.

Another CuO was prepared by using different structural agents. The second CuO was prepared by dissolving 1.0 g Cu (NO₃)₂.3H₂O in 1.0 ml of ultrapure water and 1.0 g of SDS in 10 ml of ultrapure

water followed by the addition of 2.0 g CMC in 3.0 ml of ultrapure water at 25 °C, and followed by the above procedure.

Fabrication of carbon paste unmodified and modified electrodes

Working electrode Carbon paste electrode was prepared by mixing graphite powder and paraffin oil in 7:3. ie paste had the composition of graphite powder and paraffin oil 70% and 30% respectively. Homogenization was also done by mortar and pestle for 20 min. The resultant paste was allowed to rest for 2-3 days for homogenization of paraffin oil and graphite powder. This paste is packed in the tip of a plastic syringe in which copper wires are connected for providing conducting medium. The surface of these CPE was smoothed with white paper with light pressure as the surface of the CPE become shiny the smoothing process of the surface was stopped. This prepared working electrode is known as bare CPE. The modification of these bare CPE was done with synthesized NPs, for this graphite powder, NPs and paraffin oil were mixed in 7:2:1 respectively. Firstly NPs and Graphite powder were mixed thoroughly for 10 min after that paraffin oil was added. The resulting paste was also packed in the tip of the syringe and followed the same process for the smoothening of the surface of the electrode.

Real sample preparation

Water sample

Tap water was used as a real water sample. This sample of water was filtered with Whatman filter paper to avoid PMs (particulate matters). The pH of the sample was adjusted by buffer solution the resulting sample solution has pH 7. This sample solution was kept at a low temperature.

Food sample

The tomatoes were gathered from the nearby market. Tomato Samples were chopped down into little pieces, precisely gauged, and afterward exposed to homogenization. 25 gm of sample mixed with 50ml of methanol and 0.2 gm of NaOH, in a beaker than this extract was centrifuged and then evaporated to dryness, pH was adjusted to 7 [12].

General analytical procedure

For Electrochemical measurements, 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0), supporting electrolyte (KCl), 0.02 M CTAB, and sample (OP) were taken in a clean beaker. While stirring the solution the cyclic voltammograms were recorded. The range of cyclic voltammograms was -1.00 to -1.4 V for the cathodic and anodic scans. Other voltammetric parameters were optimized as follows: modulation time 1ms, step potential -10 mV, and scan rate was 0.05Vs^{-1} to 0.1Vs^{-1} .

RESULT AND DISCUSSION

Characterization of CuO NPs

The characterization of synthesized NPs was done by FESEM-EDX, X-ray diffraction, and TEM analysis. These analyses exhibited the morphological behavior of CuO NPs as shown in Figure 1-4. X-ray diffraction analysis shows clear information about the crystallinity and phase purity of CuO NPs. These studies of XRD were shown in our work [26].

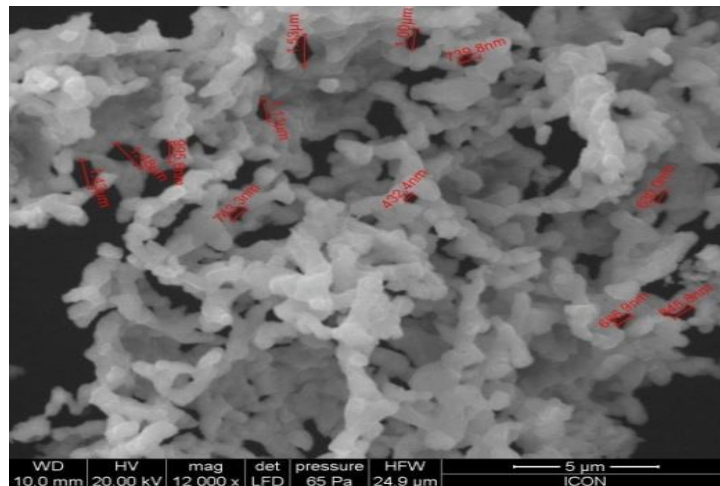


Figure 1. FESEM image of copper oxide NPs

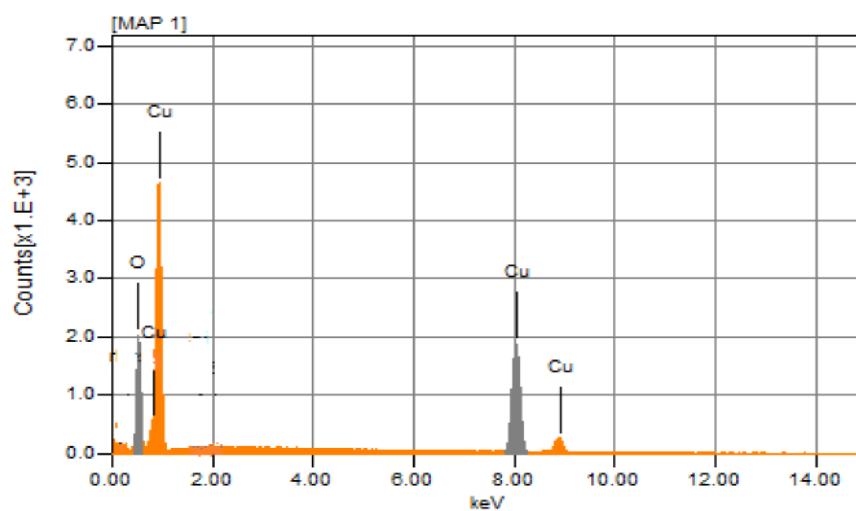


Figure 2. EDX analysis of the CuO NPs

The TEM image showed a ligament-like shape. This gives clearly close agreement with their FESEM results. The clearly shown fringes in the TEM image are the indication of the high crystalline nature of synthesized CuO NPs.

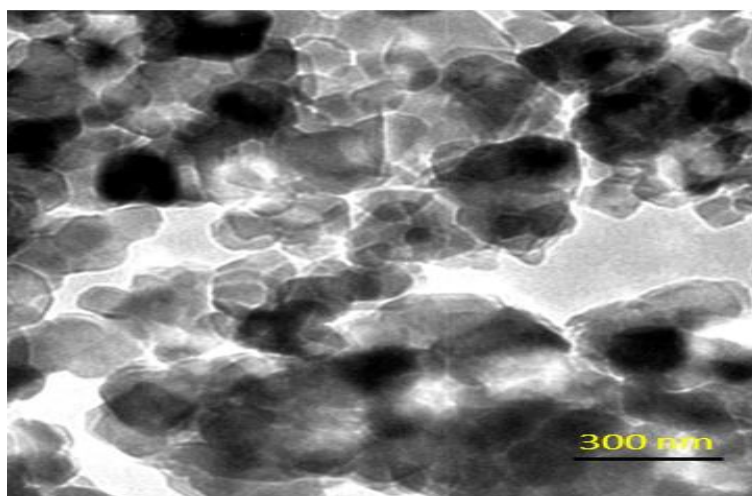


Figure 3. TEM image of porous CuO NPs

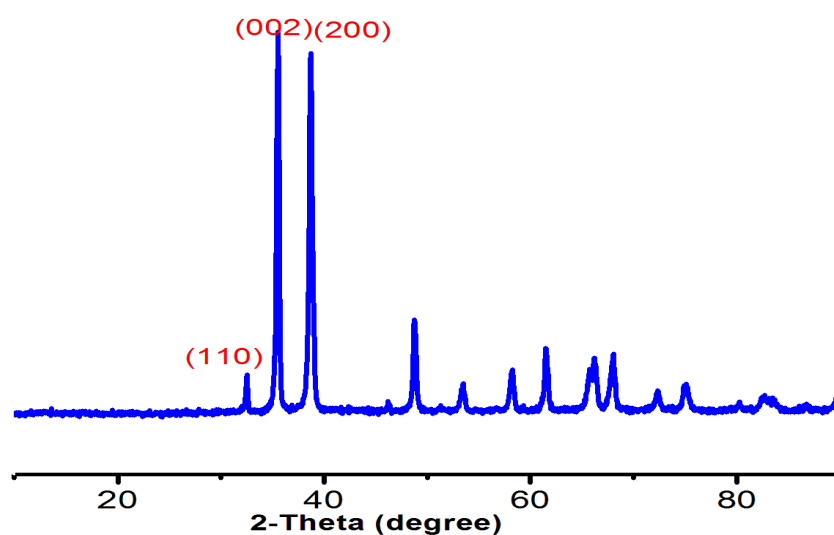


Figure 4. XRD patterns of macroporous copper-oxide (mpCuO)

EC characterization of electrode

The characterization of the surface feature of modified electrodes was done by CV.

For the calculation of surface area of CPE and NPs modified CPE Cyclic voltammograms were recorded. $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ in 1M KCl solution were taken and cyclic voltammograms were recorded. For calculation of surface area of electrodes Randles-Sevick equation [2, 9] was used. The Randles-Sevick is as follows:

$$I_{pa} = 0.4463 (F^3 / RT)^{1/2} N^{3/2} A_0 D_0^{1/2} C_v^{1/2}$$

Where I_{pa} = anodic peak current

N = number of electrons transferred

A_0 = surface area of the electrode (cm^2)

D_0 = diffusion coefficient

C = concentration of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ion

The surface area was calculated 0.0124, 0.154 and 0.140 cm^2 for carbon paste electrode, and CuO modified electrode respectively.

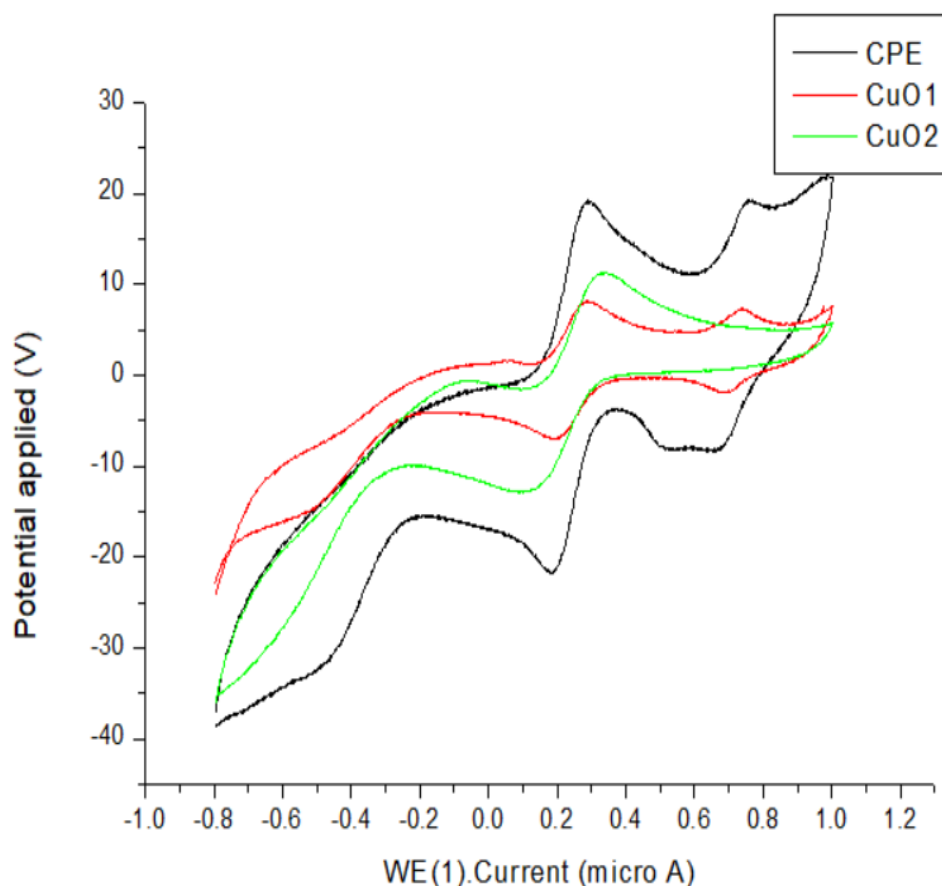


Figure 5. Cyclic voltammogram of 1.0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ in 0.1 M KCl at CPE and modified electrodes

Voltammetric behavior of pesticide

EC property was evaluated by Cyclic voltammetry. CV also provides information about the voltammetric behavior of OP pesticide. Cyclic voltammograms are shown below. The cyclic voltammogram exhibits a cathodic peak at -825mV between the potential ranges from -1.0V to -1.4V as shown in Figure 6.

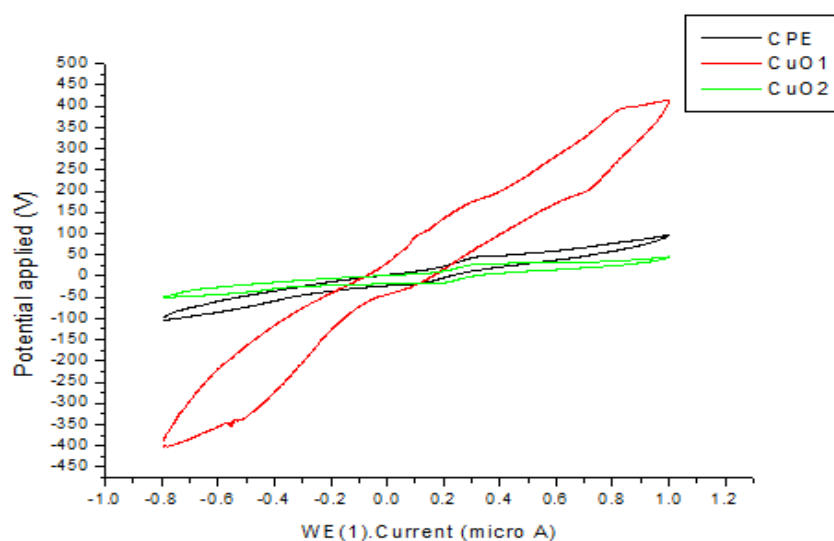


Figure 6. CV of 1.0 μM pesticide in 20mM CTAB, supporting electrolyte KCl, and 20 mM Phosphate buffer solution having pH 7.0 at all CPE and modified electrodes

EC property and the voltammetric behavior of OP pesticide were also studied with help of AdDPV. The AdDPV voltammogram of 1.0 μM OP in 20mM CTAB and 20mM phosphate buffer shows a single well-defined peak at 0.05 V as shown in Figure 7.

Effect of pH

All these studies show the effect of pH on different parameters such as peak current potential and the shape of voltammogram. So the pH of the solution is very important in the evaluation of the proton to electron ratio. Peak current is directly proportional to pH of the solution and the maximum value of peak current obtained at $\text{pH } 7 \pm 0.01$.

Effect of surfactant concentration

The rate of electron transfer may be changed if the electrode surfaces adsorb the surfactants. These surfactants affect the EC reactions as they can stabilize the radical and another reaction intermediate [13]. Surfactants can cause the formation of micellar aggregates these can affect the transportation of mass of sample to the electrodes [14] due to which change in peak current value and peak potential value is observed as the concentration of surfactants increases.

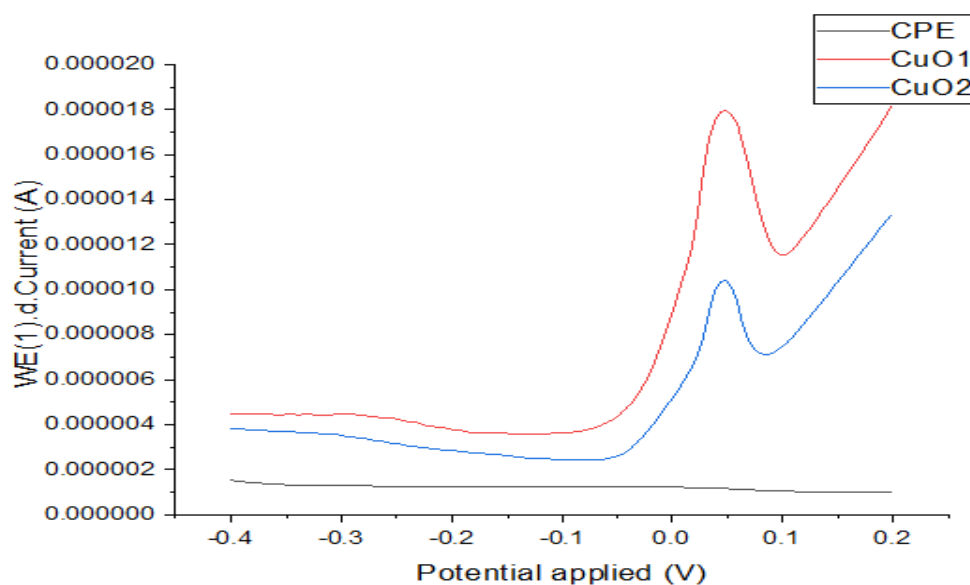


Figure 7. AdDPSvoltammogram CPE and CuO electrode without pesticide in electrolyte and phosphate buffer solution

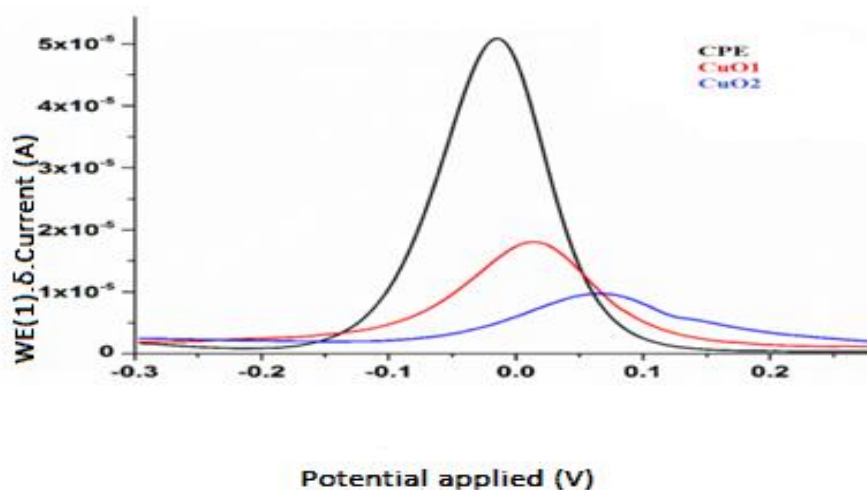


Figure 8. AdDPSvoltammogram of 1.0 μ M OP in 20mM CTAB, KCl and 20mM phosphate buffer at all CPE and modified CPEs

Specificity

In order to judge the analytical application of this suggested method, it is necessary to examine the effect of the interfering ions and organic compounds for selective determination of OP on CuO Modified CPE. Generally, some organic compound exist in the environmental samples this method have no effect of such interfering organic compounds. This method can be validated by calculating the LOD

and linearity range of OP pesticides by using peak current as a function of the concentration of the analyte at least five times under the optimized conditions [2].

Analytical application

To examine the practicability of this method and electrodes, both were used for the determination of OP pesticide in real samples. Initially, voltammetric responses were not obtained. This can be due to less concentration of pesticides or the absence of pesticides. Afterward, a very less amount of OP pesticide was added to samples. The recorded voltammogram was compared from the voltammograms which were obtained from the 1.0×10^{-6} g mL⁻¹ standard stock solution of pesticides. No such difference in peak response was observed. This indicates the better sensitivity of the newly designed electrode and practicability of the suggested method for real samples. The method is quick, cost-effective, and environmentally friendly.

Herein we have reported a sensitive and selective electrochemical sensor. This has been designed by using exclusive properties of CuO NPs such as high surface area, efficient electron transfer, and electrocatalytic properties. CV results clearly show that the CuO is effective in transferring charge on the electrode surface in the applied potential range. The designed electrode applied for examining the presence of OP pesticide in surfactant media. This method reports an accurate determination of OP pesticides in real samples with a low detection limit.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are highly thankful to the Department of Chemistry Dr. Harisingh Gour Central University Sagar (M.P.) India and Sophisticated Instrumentation Centre (SIC) of our university, for providing the necessary laboratory facilities. The author is also thankful to Prof. Ratnesh Das for providing guidance and support.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception: *R.D.*; Design: *A.C., R.D.*; Supervision: *R.D.*; Resources: *R.D.*; Materials: *A.C.*; Data collection and/or processing: *A.C.*; Analysis and/or interpretation: *R.D.*; Literature search: *A.C.*; Writing manuscript: *A.C., R.D.*; Critical review: *R.D.*; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Imran, K., Umar, J. P., Sneha, W., Ratnesh, D., Sudhir, N. L. (2016). Fabrication of electrochemical nanosensor based on polyaniline film-coated AgNP-MWCNT-modified GCE and its application for trace analysis of fenitrothion. *Ionics*, 23, 1293-1308.
2. Hanrahan, G., Patil, D.G., Wang, J. (2004). EC sensors for environmental monitoring: design, development and applications. *Journal of Environmental Monitoring*, 6, 657-664.
3. Pandit, U.J., Khan, I., Wankar, S., Raj, K.K., Limaye S.N. (2015). Development of an EC method for the determination of Bicalutamide at the SWCNT/CPE in pharmaceutical preparations and human biological fluids. *Analytical Methods*, 7, 10192-10198.
4. Habibi, B., Jahanbakhshi, M. (2014). Silver NPs/multi walled carbon nanotubes nanocomposite modified electrode: voltammetric determination of clonazepam. *ElectrochimicaActa*, 118, 10-17.
5. Zeng, Y., Yu, D., Yu, Y., Zhou, T., Shi G. (2012). Differential pulse voltammetric determination of methyl parathion based on multiwalled carbon nanotubes–poly (acrylamide) nanocomposite film modified electrode. *Journal of Hazard Material*, 217-218, 315-322.
6. Wang, J. (2005). Carbon-nanotube based EC biosensors: a review. *Electroanalysis*, 17, 7-14.
7. Zargar, B., Parham, H., Hatamie, A. (2015). EC investigation and stripping voltammetric determination of captopril at CuO NPs/multi-wall carbon nanotube nanocomposite electrode in tablet and urine samples. *Analytical Methods*, 7, 1026-1035.
8. Afkhami, A., Ghaedi, H., Madrakian, T., Nematollahi, D., Mokhtari, B. (2014). Electro-oxidation and voltammetric determination of oxymetholone in the presence of mestanolone using glassy carbon electrode modified with carbon nano tubes. *Talanta*, 121, 1-8.
9. Pandit, U.J., Khan, I., Wankar, S., Raj, K.K., Limaye, S.N. (2016). Development of EC method for determination of Tolvaptan at MWCNT/CPE in pharmaceutical preparations and human biological fluids. *Analytical Chemistry Letters*, 5, 338-350.
10. Kumaravel, A., Chandrasekaran, M. (2011). A biocompatible nano TiO₂/nafion composite modified glassy carbon electrode for the detection of fenitrothion. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 650, 163-170.
11. Abbar, J.C., Nandibewoor, S.T. (2012). Development of EC method for the determination of chlorzoxazone drug and its analytical applications to pharmaceutical dosage form and human biological fluids. *Industrial and Engineering Chemistry Results*, 51,111-118.
12. Li, C., Wang, C., Ma, Y., Hu, S. (2004). Voltammetric determination of trace amounts of fenitrothion on a novel nano-TiO₂ polymer film electrode. *MicrochimicaActa*, 148, 27-33.
13. Brahman, P.K., Dar, R.A., Pitre K.S. (2013). Conducting polymer film based EC sensor for the determination of amoxicillin in micellar media. *Sensors Actuators B*, 176, 307-314.

14. Dar, R.A., Brahman, P.K., Tiwari, S., Pitre, K.S. (2012). EC studies of quinine in surfactant media using hanging mercury drop electrode: a cyclic voltammetric study. *Colloid Surf B: Biointerfaces*, 98, 72-79.
15. Kargozar, S., Mozafari, M. (2018). Nanotechnology and Nanomedicine: Start small, think big. *Material Today*, 5(7), 15492–15500.
16. Liu, J. F., Su, B., Lagger, G., Tacchini, P., Girault, H.H. (2006). Antioxidant redox sensors based on DNA modified carbon screen-printed electrodes. *Analytical Chemistry*, 78(19), 6879-6884.
17. Fatima, M., Silvana, A. (2020). Nanotechnology-based approaches for food sensing and packaging applications. *Royal Society of Chemistry Advances*, 10(33), 19309-19336.
18. Authority, E. F. S., Schoonjans, R., Eryasa, B. (2019). Annual report of the EFSA Scientific Network of Risk Assessment of Nanotechnologies in Food and Feed for 2018. *EFSA Supporting Publications*, 16(4):1626E, 1-11.
19. Hongyong, X., Qinghua, C., Yuan, L., Zhenxing, Z., Lina, C. L., Haijun, Y. (2020). Sensors applied for the detection of pesticides and heavy metals in freshwaters. *Hindawi Journal of Sensors*, 2020:8503491, 1-22.
20. Garcia, C. V., Shin, G. H., Kim, J. T. (2018). Metal oxide-based nanocomposites in food packaging: Applications, migration, and regulations. *Trends in Food Science and Technology*, 82, 21-31.
21. Bayne, S., Carlin, M. (2017). Forensic Applications of High Performance Liquid Chromatography; CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA.
22. Carlin, M.G., Dean, J.R. (2017). Forensic Applications of Gas Chromatography; CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA.
23. Stuart, B.H. (2013) Forensic Analytical Techniques; Wiley & Sons Ltd.: Chichester, UK.
24. Smith, J.P., Randviir, E.P., Banks, C.E. (2016). An introduction to forensic electrochemistry. In Forensic Science: A Multidisciplinary Approach; Katz, E., Halámek, J., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany.
25. Yáñez-Sedeño, P., Agüí, L., Villalonga, R., Pingarrón, J.M. (2014). Biosensors in forensic analysis: A review. *Analytica Chimica Acta*, 823, 1-19.
26. Khan, G.A., War, J.A., Naikoo, G.A., Pandit, U. J., Das, R. (2016). Porous CuO catalysed green synthesis of some novel 3-alkylated indoles as potent antitubercular agents. *Journal of Saudi Chemical Society*, 1-10.



MANTARLARIN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ İLE İLGİLİ İN VİTRO, İN VİVO VE KLİNİK DEĞERLENDİRMELER

IN VITRO, IN VIVO AND CLINICAL ASSESMENT ABOUT THE MEDICINAL CHARACTERISTICS
OF MUSHROOMS

Ceren ÖZTÜRK^{1*} , Funda ATİLA² 

¹Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kırşehir,
Türkiye

²Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Kırşehir, Türkiye

ÖZ

Amaç: Mantarlar yüzyıllardan beri Uzakdoğu başta olmak üzere tüm dünyada gıda ve tıbbi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Dünya genelinde kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, kanser, obezite gibi hastalıkların hızla artması ve buna bağlı olarak tedavi ve bakım maliyetlerindeki artışlar, hem araştırmacılar hem de halk arasında alternatif tedavi yöntemlerine olan ilgiyi artmıştır.

Sonuç ve Tartışma: *In vitro* ve *in vivo* analizler ile klinik çalışmalar, başta *Pleurotus spp*, *Lentinula edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Grifolia frondosa* gibi türler olmak üzere birçok mantar türünün yüzyıllardan beri süregelen geleneksel kullanımının doğruluğunu kanıtlamakta ve mantarlardan elde edilen ana biyoaktif bileşiklerin çeşitli hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde bir potansiyele sahip olduklarını göstermektedir. Bu derlemede mantarların, günümüzde sık rastlanan kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet gibi hastalıkların önlenmesi ve tedavisindeki potansiyellerini değerlendirmek amacıyla antitümör, antioksidan, antimikrobiyal, kolesterol düşürücü ve kan şekerini düzenleyici etkileri ile ilgili güncel *in vitro*, *in vivo* ve klinik çalışmalar derlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antidiyabetik, antihiperlipidemik, antimikrobiyal, antioksidan, antitümör, mantar

ABSTRACT

Objective: For centuries, mushrooms have been used for food and medicinal purposes all over the world, especially in the Far East. The rapid increase of diseases such as cardiovascular diseases, diabetes, cancer, obesity worldwide and and increases in the costs of treatment and care of these diseases have increased the interest in alternative treatment methods among both researchers and the public.

Result and Discussion: *In vitro*, *in vivo* and clinical studies have proven the accuracy of many centuries-old traditional uses of mushrooms, especially species such as *Pleurotus spp.*, *Lentinula edodes*, *Ganoderma*

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Ceren Öztürk
e-posta / e-mail: ogr.ceren.ozturk@ahievran.edu.tr, Tel. / Phone: +905060522866

lucidum, Grifolia frondosa. Moreover, the studies show that that the main bioactive compounds derived from mushrooms have great potential in the prevention and treatment of various diseases. In this article, current in vitro, in vivo and clinical studies related to antitumor, antioxidant, antimicrobial, cholesterol lowering and blood sugar regulating properties of mushrooms were reviewed in order to evaluate the potentials in the prevention and treatment of diseases such as cancer, cardiovascular diseases and diabetes.

Keywords: Antidiabetic, antihyperlipidemic, antimicrobial, antioxidant, antitumor, mushroom

GİRİŞ

Mantarlar genel olarak, çok sayıda çok hücreli ve tek hücreli ökaryotik canlıyı kapsayan biyolojik bir âlemin adıdır. Mantarlar âleminin, mayalar, küfler ve şapkallı mantarlar olmak üzere birçok üyesi olduğu halde, bu çalışmada kullanılan mantar kelimesi ile toprak üstünde ya da altında belirgin bir sporokarpı olan, çıplak göz ile görülen, el ile toplanabilen büyük, sap ve şapkası olan, etli, yenen ve tıbbi mantarlar ifade edilmiştir.

Mantarlar, *Basidiomycetes* ve *Ascomycetes* şubelerinde yer alan makro funguslardır. Klorofil içermediklerinden dolayı fotosentez yapma yeteneği olmayan mantarlar, simbiyotik, parazitik ve saprofitik olarak beslenirler. Birçoğu, çeşitli tarımsal ve orman atıklarının ve karmaşık biyopolimerlerin parçalanması ve geri dönüşümünde önemli rol oynarlar. Mantarlar renk, tat, aroma ve doku açısından benzersiz özelliklere sahiptirler. Bu da onları tüketiciler açısından çekici kılar. Dünya üzerinde 3000'den fazla mantar türü "yenilebilir" olarak kabul edilir. Bunlardan 10 tanesi endüstriyel ölçekte yetiştirilmektedir [1]. Tüketicilerin farklı kullanımına göre, en fazla üretilen mantar türleri, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *Lentinula edodes* (Berk) Pegler, *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach, *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer ve *Auricularia auricularia -judae* (Bull.) Quéol olup, yenilebilir özellikte olmadığı halde tıbbi özellikleri nedeni ile ön plana çıkan türler ise *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst ve *Cordyceps sinensis* (L.) Link'dir.

Dünya çapında mantar üretimi 2000'li yılların başında 4.187.791 ton iken, 2018 yılında 8.993.280 tona ulaşmıştır [2]. Mantar üretimi ve tüketimdeki bu artışın başlıca nedeni, son yıllarda sağlıklı beslenmeye artan yoğun ilgi ve buna bağlı olarak yüksek besin değeri ve kaliteli protein içeriğine sahip mantarların sağlıklı besinler olarak değer kazanmalarındır. Genel olarak proteinler, değişen miktarlarda 20'den fazla amino asitten oluşur ve bunlardan 9 tanesi esansiyel amino asit (lizin, metiyonin, triptofan, treonin, valin, lösin, izolösin, histidin ve fenilalanin) olarak tanımlanır. Hayvansal kökenli gıda ürünleri, genellikle bazı önemli amino asitlerden yoksun olan bitkisel gıdalardan daha kaliteli bir protein sağlar. Hayvansal gıdalara benzer şekilde, mantar proteinleri, insanlar için gerekli olan 9 amino asitin tümünü içerirler ve dolayısıyla hayvansal ürünlere bir alternatif olarak düşünülebilirler [3]. Mantarlar, yüksek kaliteli proteinlerine ek olarak; tiamin, riboflavin, askorbik asit, ergosterol ve niasin gibi vitaminler bakımından da zengindirler [4]. Diğer taraftan kalori, karbonhidrat ve kalsiyum açısından ise düşük içeriğe sahiptirler. Mantarların kalorilerinin düşük olma sebepleri düşük yağ içerikleridir. Ancak insan

sağlığı açısından büyük önem taşıyan çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) bakımından zengindirler [5]. Ayrıca, mantarların mükemmel bir mineral akümülatörü olduğu da bilinmektedir. Mantarların yüksek miktarda çinko, demir ve mangan içermeleri, bunları dengeli bir beslenme için önemli kılar [6].

Mantarlar yüksek besin içeriklerinin yanı sıra tıbbi ve nutrasötik değerleri ile de ön plana çıkmaktadırlar. Mantarlar, tarih öncesi zamanlardan beri geleneksel tıpta “kocakarı ilacı” da dediğimiz halk ilaçları olarak kullanılmıştır. Eski Mısır hiyerogliflerinde, Antik Yunan ve Roma metinlerinde, Çin tıp metinlerinde mantarların önemleri ve tıbbi faydaları ile ilgili bilgilere rastlanmıştır [7]. Mantarlar Maya, Aztek ve İnka gibi kültürlerde de hem tıbbi amaçlar ile hem de dini ayinlerde kullanılmıştır [1]. Günümüzde yapılan çalışmalar, tıbbi mantarların geleneksel kullanımları ile ilgili bilgileri doğrulamaktadır. Bu mantarların, modern ilaçlara göre daha az yan etkilerinin bulunması ve daha iyi tolere edilebilir olmaları, tıbbi mantarlara olan ilgiyi her geçen gün arttırmaktadır. Bu özellikleri dolayısı ile mantarlar fonksiyonel gıdalar olarak kabul edilirler. Fonksiyonel gıdaların hastalıkları iyileştirdiğini iddia etmek doğru olmayabilir. Ancak mantar gibi bazı fonksiyonel gıdaların hastalık önleme, baskılama, hastalık belirtilerini ortadan kaldırma özelliklerine sahip olduklarına dair güçlü deliller ortaya koyan çok sayıda bilimsel çalışma vardır [8, 9, 10, 11]. “Bitkisel ilaçlar” tanımına göre, kurutulmuş mantarlar, miseller ve sporlar “mantar preparatları” ya da “fungal preparatlar” olarak kabul edilir [12].

Dünyadaki 14.000 ila 15.000 mantar türünden yaklaşık 700’ü tıbbi özelliklere sahiptir. Bununla birlikte, potansiyel tıbbi özelliklere sahip yaklaşık 1800 mantar türü olduğu tahmin edilmektedir [1]. Mantarların antikanser, antimikrobiyal, antiviral, antioksidan veya immünomodülatör, antioksidan, kolesterol düşürücü, detoksik vb. toplam 130’dan fazla tıbbi fonksiyona sahip oldukları ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur [13, 14, 15, 16, 17, 18]. Mantarların bu özellikleri, şapka ve misellerinde içerdikleri fenolik bileşikler, polifenoller, triterpenler lektinler, polisakkaritler, poliketitler, steroidler, alkaloidler ve antibiyotikler gibi biyolojik olarak aktif içeriklerin varlığı ile bağlantılıdır [13, 14].

Bu derlemede, Asya’da geleneksel tıpta uzun bir kullanım geçmişine sahip olan ve potansiyel terapötik yetenekleri nedeniyle son zamanlarda büyük ilgi gören mantarın, kardiovasküler hastalıklar, kanser, diyabet gibi hastalıkların önlenmesi ve tedavisindeki potansiyelleri gözden geçirilmiştir. Bu amaçla başta Web of Science, Scopus, PubMed olmak üzere çeşitli veri tabanları incelenerek, son 10 yıla ait *in vitro*, *in vivo* ve klinik çalışmalar özetlenmiştir.

Mantarların Antikanser Etkileri

Kanser, yüksek oranda ölüm ile sonuçlanan önemli bir hastalıktır. Kanserli hasta sayısının tüm dünyada sürekli olarak artması bu hastalığı küresel bir sorun haline getirmiş ve bu nedenle bu hastalığa ilaç arayışı araştırma dünyasında bir öncelik olmuştur. Tedavi amacıyla kullanılan kanser ilaçları, bazen hedefe ulaşamamalarının yanı sıra istenmeyen yan etkiler de gösterebilmektedirler. Bu durum bilim

insanlarını daha az yan etkiye sahip ve daha iyi sonuçlar elde edilebilecek farklı yollar arayışına yöneltmiştir.

Modern fitokimyasal ve farmakolojik çalışmalar, polisakkaritlerin mantarlardaki başlıca biyoaktif bileşiklerden biri olduğunu göstermiştir [19]. Makrofungal β -glukanlar (esas olarak β -1,3 ve β -1,6 glikozidik bağlar) immünomodülatör ve antitümör etkileri nedeniyle kanser tedavisinde kullanılırlar [20, 21]. Ayrıca, mantar polisakkaritlerinin, mevcut birçok kemoterapötik ilacın aksine daha az toksik yan etkileri bulunduğu bildirilmiştir. Bu nedenle kanser tedavisinde destekleyici sağlık bakımı için alternatif ilaçlar geliştirmek amacı ile kullanılabilirler [22].

Dünya çapında farklı çalışmalarda, bağışıklık tepki yollarında ve doğrudan antitümör mekanizmalarında mantarların etkileri ayrıntılı olarak incelenmiştir. Mantarların yapısında bulunan yüksek moleküler ağırlık içeren polisakkaritlerin ve sekonder metabolitlerin monositler, doğal sitolitik lenfositler ve dendritik hücreler gibi doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin üretimi uyararak bağışıklık sistemini güçlendirdiği düşünülmektedir. Mevcut araştırmalar arasında, mantarlardan izole edilen biyoaktif bileşiklerin tümör hücre hatlarının gelişimini inhibe edebildiğinin rapor edildiği birçok çalışma mevcuttur [23, 24, 25, 26]. Ayrıca mantarlar, kanser hastalarında yaygın olarak görülen mide bulantısı, anemi veya halsizlik gibi etkileri azaltabilme özelliklerinden dolayı kanser tedavilerinde alternatif seçenek olarak da görülmektedirler [27].

Geleneksel Çin tıbbında uzun yıllardan beri kullanılan *Cordyceps* cinsine ait mantar türleri, günümüzde de kanser dâhil olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadırlar. Lee ve ark. [28], *Cordyceps militaris* (L.) Link'in etanol ekstresinin, insan kolorektal kanser türevi hücre hattı olan RKO hücrelerinden meydana gelen tümör gelişimini büyük oranda engellediğini belirterek bu hücrelerin *C. militaris* etanol ekstresine karşı direnç gösteremediğini rapor etmişlerdir. Wada ve ark. [8], *C. militaris* ekstresinin yüksek miktarlarda ksilitol içerdiğini ve bu ksilitolün kanseri önlemek ve kanserli hücrelerin agresifliğini azaltmak için etkili bir bileşen olabileceğini bildirmişlerdir. Tomonobu ve ark. [29], *C. militaris*'ten elde edilen ksilitolün tümör baskılayıcı bir işleve sahip olduğunu ve ksilitolinin, kanser hücrelerini kemoterapötik ilaçlara karşı etkili bir biçimde duyarlı hale getirdiğini öne sürmüşlerdir. Çalışmada, kanserli hastalarda uygulanan ve ksilitol ile birleştirilen kemoterapötik strateji, olumlu sonuç verirken, kanserli hastaların terapötik sonuçlarının iyileştirilmesinde olumlu bir yaklaşım olabileceği vurgulanmıştır.

Huo ve ark. [30], *C. sinensis*'in (AECS) sulu ekstraktlarından elde edilen AECS1 ve AECS2'nin doza bağlı bir şekilde A549, CoLo205, NCI-H460, HCT-116, HeLa, Hep 3B2.1-7, K562, Lewis, MDA-MB-453, B16F10, Raji ve SK-MEL-28 gibi kanser hücre hatlarının gelişimini engelleyici bir etki gösterdiğini bildirmişlerdir. AECS1'in IC_{50} değerinin 0.02-3.2 mg/mL arasında ve AECS2'nin 0.31-4.08 mg/mL aralığında değiştiğini bildirerek AECS1'in *in vitro* tümörlerin gelişimini engellemede daha etkili olabileceğini savunmuşlardır. Ayrıca aynı çalışmada Lewis tümör hücresine sahip fareleri

DDP+AECS2 kombinasyonu ile tedavi etmişler ve bu kombinasyonun, DDP ile tedavi gören farelere göre daha iyi sonuç verdiğini öne sürmüşlerdir.

Jin ve ark. [31], *C. militaris* 'ten izole edilen *Cordyceps*'in, tümör apoptozunu yukarı doğru regüle ederek, hücre döngüsünün durmasını indükleyerek ve kanser kök hücrelerini (CSC) hedefleyerek tümör büyümesini inhibe ettiğini öne sürmüşlerdir. Çalışmada ayrıca *Cordyceps*'in, tümör metastazı ile ilgili yolları baskılayarak tümör mikro çevresini düzenlediğinden dolayı *Cordyceps*'nin, kanser tedavisi için önemli bir takviye veya ikame ilaç olabileceği rapor edilmiştir.

G. lucidum, iltihap azaltıcı etkisi, bağışıklık sistemini güçlendirmesi ve kanser hücrelerine karşı toksik etki sağlaması nedeniyle özellikle kanser tedavilerinde kullanılan değerli tıbbi mantar türlerinden bir tanesidir. *G. lucidum* polisakkaritleri, suda çözünür ekstraktlerdeki temel aktif bileşenlerdir. *G. lucidum* polisakkaritlerinin, kanser hücrelerinin yeni bir damar oluşturmasını önleyerek ve direkt olarak sitotoksik etki göstererek tümör hücrelerinin gelişimi engellediği bilinmektedir [32].

Qu ve ark. [9], 0.1, ve 5 mg/mL arasındaki farklı konsantrasyonlardaki *G. lucidum* triterpen ekstraktlerinin (GLT) insan prostat kanser hücrelerinde (DU-145) hücre canlılığı, istilası, yayılışı ve apoptozisi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Sonuçlar, yüksek dozda (2 mg /mL) bir GLT'nin matris metaloproteazların düzenlenmesiyle doza ve zamana bağlı bir şekilde hücre canlılığını inhibe ettiğini göstermiş ve GLT, DU-145 hücrelerinin apoptozunu indüklemiştir. Çalışma sonucunda GLT'nin, kanser hücreleri üzerindeki etkisini çeşitli mekanizmalar aracılığıyla gösterdiği ve kanserin önlenmesi ve tedavisi için potansiyel terapötik kullanıma sahip olabileceği vurgulanmıştır. Wu ve ark. [33], *G. lucidum* polisakkaritlerinin (GLP) insan prostat kanser (PCa) PC-3 hücresi üzerine etkilerini incelemiş ve uygulanan doza ve zamana bağımlı bir şekilde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 10 mg/mL konsantrasyonunda GLP uygulanan PC-3 hücrelerinin canlılıklarının 24 saatte 54.9 ± 5.4 , 48 saatte 36.4 ± 3.9 ve 72 saatte 21.5 ± 2.8 oranında azaldığını gözlemlemişlerdir. Aynı çalışmada, GLP'lerin, PCa DU145 ve LNCaP prostat kanser hücrelerine karşı da benzer etki göstererek hücrelerin yaşayabilirliğine karşı engelleyici etki sergilediği belirtilmiştir. Sohretoğlu ve Huang [34], *G. lucidum* polisakkaritlerinin, bağışıklık sistemini güçlendirme, kötü huylu tümörlerin yayılımını önleme, tümör için yeni damar oluşumunu engelleme, hücrelerin çoğalmasını engelleme vasıtası ile kanser önleyici aktivite gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Wang ve ark. [10], *G. lucidum*'dan izole edilen ve bir triterpenoit olan Ganoderik asit-A'nın insan hepatosellüler karsinom hücre hatlarına etkisini belirlemek üzere, farklı zaman dilimlerinde (24, 48 ve 72 saat) ve farklı konsantrasyonlarda (50, 100, 150, 200, 250 ve 300 $\mu\text{mol/L}$) yaptıkları uygulama sonucunda, 48 saat-100 $\mu\text{mol/L}$ dozunda Ganoderik asit-A uygulamasının ardından HepG2 ve SMMC7721 insan hepatosellüler karsinom hücre hatlarının gelişimini önemli boyutta engellendiğini bildirmişlerdir. Ayrıca 72 saat 75 $\mu\text{mol/L}$ dozunda Ganoderik asit-A maruziyetinin benzer etki göstererek iki hücrenin de gelişimini önemli derece engellediği rapor edilmiş ve elde edilen sonuçlara göre en ideal tedavinin 100 ve 75 $\mu\text{mol/L}$ olduğu öne sürülmüştür.

Zhao ve He [35] çalışmalarında, *G. lucidum* ekstralarının çok yüksek triterpenoit içeriğe sahip olduğunu ve ayrıca *G. lucidum* ekstralarından, Ganoderik asit A, Ganoderenik asit A, Ganoderik asit B, Ganoderik asit H, Ganoderik asit C2, Ganoderenik asit D, Ganoderik asit D, Ganoderik asit G, Ganoderik asit Y, Kaemferol, Genistein ve Ergosterol dâhil olmak üzere 12 bileşiğin tanımlandığını bildirmişlerdir. Bu 12 bileşiğin kanseri önleme ve sinyal iletim yolları ile yakından bir ilişkisi olduğunu öne sürmüşlerdir. Martínez-Montemayor ve ark. [36], *G. lucidum* ekstraktından elde edilen 10 µM dozda ergosterol peroksit (EP) uygulanan kanser hücrelerinin saldırganlığında azalma gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Bunun dışında 15 µM öldürücü olmayan dozda EP muamelesi ardından hücrelerin saldırganlığında ekstra azalma gözlemlendiği öne sürülmüştür. Araştırmacılar, elde edilen sonuçlara göre, EP uygulaması sayesinde SUM-149 enflamatuvar meme kanseri (IBC) yayılımının engellenebileceğini savunmaktadırlar.

Pleuran, *Pleurostus ostreotus*'tan ekstre ile elde edilen β-glukan bileşiğidir. Bu bileşiğin, kolorektal kanser hücreleri HT-29 [37], prostat kanseri hücreleri PC-3 [38] ve meme kanseri hücreleri MCF-7 [39] gibi çeşitli hücrelerin çoğalmasını engelleyebilen bir etki gösterdiği çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Tong ve ark. [40], *P. ostreatus*'un meyvelerinden suda çözülebilen bir polisakkarit olan POPS-1'i elde etmişlerdir. POPS-1'in, *in vitro* ortamda HeLa tümör hücresine karşı yüksek antitümör aktivitesi sergilediği ve 5-florourasil'e kıyasla daha az toksisiteye sahip antitümör ajan geliştirmek için uygun bir kaynak olabileceği kanısına varmışlardır. Lektinler, kanser hücrelerinin yok olmasını ve aktif lenfositlerin artmasını sağlamaktadır [41]. Saşata ve ark. [42], *P. ostreatus*'un içeriğinde bulunan başta β-glukan ve lektin olmak üzere birçok biyoaktif bileşenin kanser tedavisinde kullanılabilmesini ve özellikle kanserin ileri tedavilerinde, genellikle büyük ölçekli yayılımlarda ve farklı kanser çeşitlerinin kemoterapi ve radyoterapisine destekleyici bir ajan olarak kullanımının olumlu etkilere yol açacağını vurgulamışlardır. *P. ostreatus*'tan izole edilen lektinlerin, leiomyoma ve hepatom gelişimini önemli bir düzeyde engellediği de bilinmektedir [43]. Wu ve ark. [44], genel olarak *Pleurotus* türlerinden izole edilen enzimlerin sağlığa faydalı ve iyileştirici etkiler sergilediğini ve *P. djamor* kökenli ribonükleazın, akciğer ve meme kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediğini bildirmişlerdir. *Pleurotus eryngii* (DC. ex Fr.) Quel. 'den alınan ekzopolisakkaritlerin, insan hepatom hücreleri üzerinde daha yüksek antitümör aktivitesi sergilediği [45] ve HepG-2 hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı bildirilmiştir [46]. Wu ve ark. [47] yürüttükleri diğer bir çalışmada, *Calvatia lilacina* (Mont. & Berk.) Henn., *P. ostreatus* ve *Volvariella volvacea* (Bull.) Singer mantarlarından elde edilen protein ekstralarının insan monositik lösemi hücre hattı (THP-1) ve insan kolorektal adenokarsinoma hücre hattının (SW480 hücreleri) canlılıklarına etkilerini araştırmışlardır. Bu mantarlardan elde edilen protein ekstralarının yeni bir antikanser ilacın önemli bir ham maddesi olarak düşünülebileceğini rapor etmişlerdir.

Wiater ve ark. [48, 49], *L. edodes*, *P. ostreatus*, *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr.) P. Karst. ve *Laetiporus sulphureus* Bull.: Fr. mantar türlerinin şapkalardan izole ettikleri α-(1 → 3) D-glukanları

(karboksillenmiş (CM)- α -(1 → 3) D-glukan) 200 μ g/mL dozunda HeLa hücrelerine uyguladıklarında; *P. betulinus* ve *L. sulphureus* türlerinden izole edilen CM- α -(1 → 3) D-glukanlarının, hücre canlılığını %50, *L. edodes*'ten elde edilen CM- α -(1 → 3) D-glukanlarının %30, *P. ostreatus* CM- α -(1 → 3) D-glukanının ise %40 oranında azalma sağladığını rapor etmişlerdir. Sharif ve ark. [50], *G. lucidum*, *P. ostreatus*, *V. volvacea*, *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers ve *L. edodes* türlerinin HT-29 kolon kanser hücre hattına karşı 200 μ g/L doz uygulamasından sonra başta %84 oranı ile *P. ostreatus* olmak üzere, *V. volvacea*'nın %83, *L. edodes*'in, %68, *H. erinaceus*'un %66 ve *G. lucidum*'un %29 oranlarında hücre gelişimini engelleyici etkinlik sergilediğini bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmada, H-1299 akciğer karsinom hücre hattının gelişimlerinin engellenmesinde *H. erinaceus*'un %72, *P. ostreatus*'un %61 ve *G. lucidum*'un %24 oranında pozitif etki gösterdiği vurgulanmıştır. Facchini ve ark. [51], *P. ostreatus* misellerinden elde edilen polisakkaritlerin (FS, FI, FII, FIII-1, FIII-2) Sarkoma 180 ve Ehrlich tümör gelişimini durdurduğunu öne sürmüşlerdir.

L. edodes'ten izole edilen ve saflaştırılmış bir polisakkarit türü olan lentinan, kanser tedavilerinin etkinliğini artırmada büyük bir rol oynamaktadır. Zhang ve ark. [52] çalışmalarında, *L. edodes*'ten elde ettikleri polisakkaritin (JLNT), Sarcoma-180 tümör hücrelerine ve insan kolorektal kanser hatlarına karşı tümör engelleyici etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmada, polisakkaritlerin tümör engelleyici aktivitelerinin monosakkarit içeriği ve molekül ağırlıklarıyla ilgili olabileceği öne sürülmüştür. Finimundy ve ark. [53], çalışmalarında, *L. edodes*'in doğal tümör engelleyici ajan olabileceğini ve kanser hücrelerinin büyümesini önemli ölçüde engelleyebileceğini bildirmişlerdir.

Zhang ve ark. [54], *A. bisporus* (kahverengi) polisakkaritlerinin *in vivo* ve *in vitro* kuvvetli bağışıklık sistemini uyarıcı ve tümör önleyici biyoaktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Smiderle ve ark. [55], *A. bisporus*'un α -glukan (%20.4), β -glukan (%23.7) ve galaktomannan (%55.8) olmak üzere üç temel polisakkarit içerdiğini bildirmiştir. Pires ve ark. [56], *A. bisporus*'tan mannoz (%27.3), galaktoz (%24.4) ve glukan (%48.5)'dan meydana gelen mannogalaktoglukan elde etmişler ve mannogalaktoglukanın, mitokondrial ölüm yolu ile apoptozu uyararak tümör hücrelerin gelişimini engellediğini ve kanser tedavilerinde kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Poyraz ve ark. [57], *Morchella* türlerine ait ekstralarının K562 hücre hattına karşı %36-72 oranları arasında sitotoksikite gösterdiğini bildirmişlerdir. Song ve ark. [58], tıbbi ve yenilebilir mantar türlerinden biri olan *Inonotus obliquus* (Pers.:Fr.) Pilát 'un fenolik bileşikler, melaninler ve lanostan tipi triterpenoitler gibi daha birçok sekonder metabolitleri içerdiğini ve *I. obliquus* kaynaklı polisakkaritlerin bağışıklık sistemini uyararak, tümör gelişimini engelleyici bir etki gösterebileceğini bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra aynı çalışmada *I. obliquus* ekstralarının antioksidatif kabiliyeti kanser hücrelerinin oluşmasını engelleyici bir etki oluşturabileceği de öne sürülmüştür.

Schizophyllum commune Fr.- Split Gill. 'den izole edilen şizofilan adlı polisakkarit, kimyasal yapı bakımından lentinan'a benzeyen bir β -glukandır. Çöl ve ark. [59], *S. commune*'nin misel ve kuru mantar

ekstrelerini kullanarak prostast kanser hücre hattı (PC-3) ve servikal kanser hücre hatları (HeLa) üzerine sitotoksik etkilerini araştırmışlar ve hem misel hem de kuru mantar ekstratlarının PC-3 ve HeLa'ya karşı oldukça yüksek sitotoksik etkiye sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Kosanić ve ark. [60], *Lactarius deliciosus* (L.) Gray mantarının HeLa hücreleri üzerinde ve *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer 'in ise A549 ve LS174 hatları üzerinde önemli bir kanser engelleyici etki gösterdiklerini belirtmişlerdir. *M. procera*'nın sulu ekstresinin, kolon kanser hücrelerinin yayılımını engellediği Xu ve ark. [61] tarafından da öne sürülmüştür.

Mei ve ark. [62], *Phellinus linteus* (Berkeley & M. A. Curtis) misellerinden izole ettikleri PLPS-1 ve PLPS-2 polisakkaritlerinden, PLPS-1'in Sarkoma-180 hücrelerinin çoğalmasında kuvvetli derecede engelleyici bir etki gösterdiğini, ancak PLPS-2'nin benzer bir etkisi olmadığını belirterek bu durumun aralarındaki yapısal farklılıklardan kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir. Hispolon *P. linteus* mantar türünden elde edilen fenolik içeriklerden biri olup, mesane ve meme kanser hücrelerini yok edebilme kabiliyetine sahiptir [63]. Huang ve ark. [64] çalışmalarında, *P. linteus* misel kültür ekstresinin (MCPL-7) 8 hafta boyunca düzenli bir şekilde uygulandığında tümör boyutunda önemli derecede azalma gözlemlendiğini ve T hücrelerin sayısında bir artışın söz konusu olduğunu rapor etmişlerdir. Pei ve ark. [65], *P. linteus* misellerinden izole edilen PL-N1 polisakkaritini A-549, Bel7402, HCT-8 ve HepG2 kanser hücre hatlarına 50 µg/L konsantrasyonda uygulamışlar ve PL-N1'nin 50 µg/mL konsantrasyonda, *in vitro* ortamda HepG2 hücrelerinin %13 oranında gelişimini engellediğini 200 µg/mL konsantrasyonda ise HepG2 hücrelerine karşı maksimum seviyede (%24) engelleyici etki gösterdiğini öne sürmüşlerdir.

Agaricus blazei Murill, ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda, bağışıklık sistemini güçlendirici, kanser önleyici ve kanserli hücrelerin yayılımını engelleyici etkisinin bulunduğu rapor edilmiştir [66]. Niu ve ark. [67], düşük molekül ağırlıklı *A. blazei* ekstresinin karaciğer tümör hücresinin yayılımını engellediğini bildirmiş ve kanser tedavisi için umut verici bir tümör ajanı olabileceğini öne sürmüşlerdir. Matsushita ve ark. [68], *A. blazei*'nin sıcak sulu ekstresinin, pankreas kanser hücrelerinin gelişimini önemli derece engellediğini bildirmişlerdir.

Grifola frondosa (Dicks.) Gray (Maitake)'dan izole edilen β-glukan'ın, kanser tedavisinde kullanılan sisplatinin etkinliğini arttırdığı belirtilmektedir [69]. Alonso ve ark. [70], *G. frondosa*'nın MD-fraksiyonlarını değerlendirmek amacı ile yürüttükleri çalışmalarında MD-fraksiyonlarının meme kanser hücrelerine karşı doğrudan bir etki yaptığını ileri sürmüşlerdir. MD-fraksiyonlarının önemli derecede tümör engelleyici özellik göstermesinin nedeni kanser hücrelerini baskılamasının yanı sıra bağışıklık sistemini güçlendirmesidir. Vücudun bağışıklık sistemini güçlendirerek tümör hücrelerinin gelişimini, yayılımını ve normal hücrelerin kanserli hücrelere dönüşmesini engellemektedir [71].

Roca-Lema ve ark. [72], *Trametes versicolor* (L.) Quel ve *G. frondosa*'dan elde edilen ekstresinin insan kolon karsinomu LoVo ve HT-29 hücrelerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında,

hücreleri 10 µg/L ve 250 µg/L arasında farklı konsantrasyonlara sahip mantar ekstraktları ile muamele etmişler ve 24 saatlik muameleden sonra hücrelerin canlılığına karşı bir etkisinin olmadığını gözlemlemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre, 48 saatlik muameleden sonra çok az bir azalma gözlemlendiği bildirilirken, 72 saatlik muameleden sonra minimum konsantrasyonda (10 µg/L) %40 oranında hücre canlılığının azaldığı tespit edilmiştir. HT-29 hücrelerine karşı ise *T. versicolor* ekstraktlarının 24, 48 ve 72 saatlik muamelelerden sonra önemli bir etkisinin olmadığını bildirilmiştir. Bununla birlikte 72 saatlik µg/L konsantrasyonundaki *G. frondosa* uygulamasından sonra kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında %40 oranında bir azalmanın gözlemlendiğini rapor etmişlerdir. Sitotoksikite etkisi bakımından, HT-29 hücrelerine karşı 50µg/L konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saatlik zamanlarda kuvvetli bir azalmanın gözlemlendiğini vurgulamış ve 72 saatlik 100 µg/L *G. frondosa* muamelesinin ardından %60-70 oranlarında azalma sergilendiği öne sürülmüştür.

F. velutipes'ten elde edilen bağışıklık sisteminin aktivatörü olan protein FIP-fve, kanser engelleyici etki sergilemektedir [73]. Krasnopolskaya ve ark. [74], çalışmalarında *F. velutipes* sıvı kültür miselyumlarından elde edilen polisakkaritlerin tümör büyümesini %94 düzeyinde durdurduğunu bildirmiştir. Latha ve Baskar [75], *Pleurotus florida* (Mont.) Singer ve *Hypsizygos ulmarius* (Bull.:Fr.) Redhead türlerinin saflaştırılmış polisakkaritlerinin antikanser potansiyelini, MCF meme kanseri hücre hatları üzerinde MTT testi ile değerlendirmişler ve bu mantar türlerinin saflaştırılmış polisakkaritlerinin hücre canlılığını önemli oranda azalttığını (sırası ile %66.48 ve %47.63) ve *H. ulmarius* polisakkaritlerinin antikanser potansiyeli açısından ümit verici olduğunu öne sürmüşlerdir.

Mantarların Antioksidan Etkileri

Normal temel metabolik süreçlerin yanı sıra hava kirliliği, alkol, sigara, ağır metaller, pestisitler, bazı ilaçlar ve radyasyona maruz kalma gibi dış kaynaklar organizmalarda serbest radikallerin oluşumuna sebep olmaktadır [76]. Bu serbest radikallerin vücutta fazlalığı romatoid artrit, arterioskleroz, siroz ve kanser gibi birçok hastalığa neden olabilir ve yaşlanmayı hızlandırabilir. Antioksidanlar, canlı organizmada ortaya çıkan serbest radikal reaksiyonlarını ve hücre hasarı önler [77]. Yapay antioksidanlardan bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve bütillenmiş hidroksitolüen (BHT)'nin hayvanlarda [78] ve insanlarda [79] kanserojen etkilere sahip oldukları belirlendiğinden, insan vücudunu oksidatif hasarın etkisinden korumak için meyve, sebze, otlar ve mantarlarda varolan doğal antioksidanların araştırılmasına yönelik ilgi artmıştır.

Mantarların fenolik içerikleri ile antioksidan içerikleri arasında bir korelasyon bulunduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir [80, 81, 82]. Fenolik bileşenler arasında fenolik asitler, flavonoidler, hidroksibenzoik asitler, hidroksisinnamik asitler, lignanlar, tanenler, stilbenler ve oksitlenmiş polifenoller bulunmaktadır [83]. Bu bileşenler, antioksidan moleküllerin sentezlenmesinde uyarıcı bir görev görmektedirler.

Palacios ve ark. [84], yaptıkları bir çalışmada *A. bisporus*, *Boletus edulis* Bull.: Fr. Sensu Jato, *Calocybe gambosa* (Fr.) Donk, *Cantharellus cibarius* Fr., *Craterellus cornucopioides* Persoon, *Hygrophorus marzuolus* (Fr.) Bres., *L. deliciosus* ve *P. ostreotus* türlerinin fenolik ve flavonoid içeriklerini değerlendirmişler ve en yüksek fenolik içeriğe sahip türün *B. edulis* olduğunu ve bunu sırasıyla *A. bisporus*, *C. cibarius*'un takip ettiğini, en düşük fenolik içeriğe sahip türün ise *H. marzuolus* olduğunu rapor etmişlerdir. Flavonoid içerikler bakımından ise en yüksek değere sahip olan mantar türünün *L. deliciosus* olduğu bildirilirken; *A. bisporus*, *P. ostreotus* ve *C. gambosa* türlerinin en düşük içeriğe sahip oldukları belirtilmiştir. Tıbbi bir mantar türü olan *H. erinaceus* ile ilgili yapılan bazı çalışmalar sonucunda taze ve kuru şapka ekstrelerinin yüksek fenolik içerik ve yüksek ferrik indirgeyici antioksidan gücü (FRAP) gösterdiği rapor edilmiştir [82, 85, 86]. Woldegiorgis ve ark. [87] tarafından yürütülen çalışmada, *Agaricus campestris* T. 'nin 14.7 mg/GAE/g değeri ile diğer türler arasında en fazla fenolik içeriğe sahip olduğunu bildirirken, *Termitomyces letestui* (Pat.) R. Heim ve *Termitomyces clypeatus* R. Heim türlerinin 10.7 mg GAE/g ve 10.5 mg GAE/g toplam fenolik içeriğe sahip olduğu bildirilmiştir. Toplam flavonoid içerikleri açısından ise *A. campestris* türünün 1.97 mg CE/g ile en yüksek değere sahip olduğu vurgulanırken en düşük değere sahip olan türün *T. microcarpus* 0.17 mg CE/g olduğunu belirtilmiştir. Ferulik asitler A, C ve E vitamin vb. gibi antioksidan bileşenlerin etkinliğini artırmada büyük bir rol oynamaktadır. Aynı çalışmada ferulik asit miktarları incelenmiş ve en yüksek miktara sahip olan türün *A. campestris* (20.3 µg/g) ve en düşük miktara sahip türün *Laetiporus sulphureus* (0.89 µg/g) olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra *P. ostreatus* ve *L. sulphureus* türlerinde ferulik aside rastlanılmadığı kaydedilmiştir.

Askorbik asit, önemli bir antioksidan olmakla birlikte, hücrelerin onarılmasında büyük bir role sahiptir. Rajasekaran ve Kalaimagal [88], *G. lucidum* etanol ekstresinin 42.41 ± 2.21 mg/g fenolik, 13.57 ± 1.57 mg /g flavon ve 1.33 ± 0.12 mg/g askorbik asit içerdiğini rapor etmişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre *G. lucidum*'un mükemmel bir antioksidan içeriğe sahip olduğunu ve iyi bir antioksidan gıda takviyesi olabileceği vurgulanmıştır.

Kozarskive ark. [89], *Agaricus brasiliensis* (Murill.), *A. bisporus*, *G. lucidum* ve *P. linteus* türleri ile yürüttükleri çalışmalarında DPPH radikal süpürme, demir iyonlarını jelatlama ve indirgeyici güç yöntemlerini kullanarak bu mantarların antioksidan aktivitelerini belirlemişlerdir. Çalışmada, *G. lucidum* ve *P. linteus* türlerinin antioksidan aktivitelerinin eşit olduğunu ve en düşük antioksidan aktiviteye sahip türün ise *A. bisporus* olduğunu vurgulamışlardır. *P. linteus* (0.1-10 mg/mL konsantrasyonda %77.9- %86.9) ve *G. lucidum*'un (0.1-10 mg/mL konsantrasyonda %58.8-%94.5) polisakkarit ekstrelerinin DPPH süpürme aktivitelerinin neredeyse askorbik asit (0.1-10 mg/mL konsantrasyonda %80.6- %86.6 arasında) gibi olduğu ve bu iki türün indirgeyici güçlerinin *A. bisporus*'un polisakkarit ekstrelerinden 30 kat daha yüksek olduğu rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada, *A. bisporus*, *A. brasiliensis*, *G. lucidum*

ve *P. linteus*'un toplam glukoz içeriklerinin sırasıyla 63.8±0.9 g/100g, 40.1±1.0 g/100 g, 20.8±0.5 g/100 g ve 24.5±1.3 g/100 g olduğu saptanmıştır.

Abdullah ve ark. [90], istiridye mantar türlerinin antioksidan kapasitelerini DPPH radikal süpürme kapasitesi β-karoten beyazlatma aktivitesi, indirgeyici güç yetenekleri ve lipit peroksidaz inhibasyonu yöntemlerini kullanarak araştırmışlar ve bu türler arasında, en yüksek antioksidan potansiyeline sahip türün *Pleurotus flabellatus* (Berk. & Br.) (%18.4) olduğu ve bunu sırasıyla *P. florida* (%16.6), *P. eryngii* (%15.6), *Pleurotus cystidiosus* O. K. Miller (%14.6) ve *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer 'ın (%14.6) takip ettiğini bilirmişlerdir. Aynı çalışmada, en yüksek antioksidan potansiyeline sahip olan tür %30.1 ile *G. lucidum* olarak belirlenirken, en düşük potansiyele sahip tür %12.0 oranı ile *F. velutipes* olarak saptanmıştır.

İnsan vücudunda selenyum minerali kilit bir rol oynamaktadır. Bağışıklık sistemini güçlendirmesinin yanı sıra iltihaplara karşı antioksidanları aktive etmede önemli bir rolü vardır. Fasoranti ve ark. [91], *Pleurotus* spp.'nin yetiştirme ortamlarını selenyum ile destekleyerek antioksidan aktivitesinin arttığını gözlemlemişler ve elde edilen sonuçlara göre selenyum ile desteklenen ortamlardan elde edilen *Pleurotus* spp.'nin vücudu oksidatif zararlara karşı koruyabilecek doğal bir antioksidan kaynağı olabilme potansiyeline sahip olabileceğini rapor etmişlerdir.

Mantarın antioksidan içerikleri ile ilgili çalışmalar genellikle *in vitro* ortamda yürütüldüğü halde bazı *in vivo* çalışmalar da mevcuttur. Karbon tetraklorürün (CCl₄) farelerde oluşturduğu oksidatif stresin *P. ostreatus*'tan elde edilen ekstratlar [92, 93] ve suda çözünmeyen polisakkaritler [94] ile azaltıldığını ya da önlendiği rapor edilmiştir. Liu ve ark. [95] yürüttükleri *in vivo* deneylerde farelere ardışık 30 gün boyunca sonda yoluyla *A. bisporus*'un etanolik ekstresi uygulamışlardır. Bu uygulamanın, farelerin serumlarında, karaciğerlerinde ve kalplerinde antioksidan enzim aktivitelerini önemli ölçüde arttırdığını belirlemişlerdir. Xu ve ark. [96], *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. (Pp) 'un yüksek antioksidan potansiyele sahip olduğu ve oral Pp uygulamasıyla farelerde %93.1 inhibisyon oranı ile tümör (Huh7 karaciğer kanseri hücreleri) insidansını ve büyüklüğünü belirgin şekilde inhibe edebileceğini, ek olarak Pp ile tedavi edilen farelerde vücut ağırlıkları ve ana organlarında belirgin bir yan etki gözlenmediğini rapor etmişlerdir. Ayrıca, farelere bir Pp'nin bir kemoterapi ilacı olan sisplatinin düşük dozları ile beraber kullanıldığında önemli bir sinerjistik etki yaratacağını belirtmişler ve Pp'nin karaciğer kanseri kemoterapisinde bir adjuvan uygulama olarak potansiyele sahip olduğunu vurgulamışlardır.

Meng ve ark. [97], *Morchella esculenta* (L.) Pers. 'ten elde edilen SO-01 ekzopolisakkaritin (EPS) antioksidan kapasitesini, farelerin midelerini şırınga ile farklı EPS dozlarıyla (25, 50, 100, 200, 400 mg EPS/ kg vücut ağırlığı) doldurduktan sonra *in vivo* olarak ölçülmüşlerdir. Kan, dalak, karaciğer, kalp ve böbrek süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinin sırası ile %125, %46.11, %23.33, %12.19, %41.29 oranında ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitelerinin ise %63.24, %63.12, %166.54, %98.01, %57.68 oranında arttığını; malonaldehit (MDA) düzeylerinin %21.80, %67.84, %28.48, %56.15,

%41.62 oranında azaldığını rapor etmişlerdir. Jayakumar ve ark. [98], *P. ostreatus*'un etanol ekstrelesinin güçlü bir antioksidan aktiviyete sahip olmasının yanı sıra, lipit peroksidasyonunun yoğunluğunu azaltarak ve enzimatik aktiviteleri (SOD, katalaz ve Gpx) ve enzimatik olmayan antioksidan (askorbik asit (C vitamini), α -tokoferol (vitamin E), glutatyon (GSH), karotenoitler, flavonoidler) seviyelerini artırarak iyi bir *in vivo* antioksidan aktivite sergilediğini rapor etmişlerdir. Çalışmada, mantar ekstresinde bulunan askorbik asit, α -tokoferol, β -karoten ve flavonoid bileşiklerin gözlenen bu etkilerle ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Araştırmacılar bu mantar kolayca bulunabildiğinden dolayı zengin bir antioksidan kaynağı olarak diyetle dâhil edilebileceğini ve oksidatif stres kaynaklı hastalıkları tedavi etmek için bir gıda takviyesi veya farmasötik bir ajan olarak da düşünülebileceğini önermişlerdir.

You ve ark. [99], *L. edodes*'ten LT1, LT2 ve LT3 polisakkaritlerini izole etmişlerdir. Elde edilen üç polisakkaritin antioksidan enzimlerin (SOD, GSH-Px) etkinliğini artırdığını bildirerek, *in vivo* çalışmalarında maksimum seviyede antioksidan aktivite sergileyen polisakkaritin LT2 olduğunu bildirmişlerdir.

Yan ve ark. [100], *Phellinus linteus* (Berk. et Curt.) misellerinden elde edilen PLP1-I suda çözünür polisakkaritin *in vivo* antioksidan etkinliklerini araştırmışlardır. D-Galaktoz ile uyarılan fareler, SOD, katalaz (CAT) ve GSH-Px gibi antioksidan enzimlerinin etkinliklerini büyük oranda artırdığını kaydetmişlerdir. Aynı zamanda bu uygulama yaşlanan farelerin bağışıklık sistemlerini güçlü bir şekilde uyardığından PLP1-I doğal bir antioksidan kaynağı olarak nitelendirilmiştir.

Mantarların Antimikrobiyal Etkileri

Mantar miselleri, sap ve şapkalarının, antimikrobiyal etki gösteren antibiyotik kaynağı oldukları ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Barros ve ark. [101], *L. deliciosus*'un *Sarcodon imbricatus* ve *Tricholoma portentosum*'tan daha fazla antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğunu bildirmiştir. Çalışmada ayrıca, toplam fenollerin ve flavonoid içeriklerin antimikrobiyal aktivite ile doğrudan ilişkili olduğu öne sürülmüştür.

Skalicka-Wozniak ve ark. [102], *G. lucidum* polisakkaritlerinden elde ettikleri D-glukoz bileşeninin, bakterilerin gelişimini engellemede yüksek düzeyde aktivite sergilediğini rapor etmişlerdir. Tamilselvan ve Rajesh [103], *G. lucidum*'un etanol ekstrelerinin, saf su, hekzan ve aseton ekstrelerine kıyasla en yüksek düzeyde antibakteriyel ve antifungal etkinlik sergilediğini ve etanol ekstrelerinin, *Staphylococcus aureus* (29 mm) ve *Pseudomonas aeruginosa* (26 mm) bakterilerine karşı maksimum düzeyde antibakteriyel etki gösterdiğini ve ayrıca *Fusarium* spp. (25.5 mm) fungusuna karşı güçlü bir antifungal etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca *G. lucidum*'un farklı ekstrelerinin bir antibiyotik türü olan gentamisin sülfat ile kıyaslandığında neredeyse aynı düzeyde etki gösterdiğini öne sürmüşlerdir.

Ramesh ve Pattar [104], *Escherichia coli*'ye karşı en iyi *in vitro* antibakteriyel etkinliğe, başta *Lycoperdon perlatum* (24.0 mm) olmak üzere sırasıyla *P. pulmonarius*, *Marasmius oreades* ve *Clavaria vermicularis* türlerinin sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Getha ve ark. [105], Polyporales takımına ait çeşitli mantarların *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Rhodotorula glutinis*'e karşı antimikrobiyal etkinliklerini değerlendirdikleri çalışmalarında *Ganoderma* cinsine ait izolatlardan elde edilen ekstrelerin %62.5 oranında, *Rigidoporus* cinsinden elde edilen ekstrelerin ise %27.2 oranında yüksek derecede antimikrobiyal etkinlik sergilediğini bildirmişlerdir. En düşük antimikrobiyal etkinlik gösteren *Phellinus* cinsine ait türlerinin ekstrelerin %7.8 oranında antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Suseem ve ark. [106], *Pleurotus eous*'un petrol eteri, etil asetat, metanol ve sulu ekstrelerin *B. subtilis*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyel etkinliklerini test ettikleri çalışmalarında, türlerin petrol eter ekstrelerin MIC değerleri, 8.8 µg/mL (*P. aeruginosa*), 4.4 µg/mL (*K. pneumoniae*), 4.4µg/mL (*S. aureus*), 4.2 µg/mL (*B. cereus*), 3.1 µg/mL (*B. subtilis*), 3.1 µg/mL (*E. coli*) olarak belirlenmiştir.

Kosanić ve ark. [107], *Boletus aestivalis*, *B. edulis* ve *Leccinum carpini* türlerinin aseton ve metanol ekstrelerin *in vitro* antimikrobiyal aktivitesini inceledikleri çalışmalarında en yüksek antimikrobiyal etkinlik *Enterococcus faecalis*'e (gram pozitif bakteri) karşı *Leccinum carpini* türünün aseton ekstraktında (MIC = 1.25 mg/mL) saptanmıştır. Çalışmada *B. aestivalis* ve *B. edulis* türlerinin aseton ve metanol ekstraktlarının neredeyse benzer antimikrobiyal etkinliklerde olduğu bildirilirken, 2.5 mg/mL, 5 mg/mL ve 10 mg/mL konsantrasyonların *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium purpurescens* (*E. faecali*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *E. coli* 'nın gelişimini önleyebileceği öne sürülmüştür.

Kosanić ve ark. [18] yaptıkları bir diğer çalışmada, *Amanita rubescens* (Blusher) , *C. cibarius*, *Lactarius piperatus* (L.) Pers. ve *Russula cyanoxantha* (Schaeff.) Fr. türlerin aseton ve metanol ekstrelerinde kuvvetli bir antimikrobiyal etki sergilediğini bildirmişlerdir. Deneme sonuçlarına göre *L. piperatus* türünün aseton ekstresi *E. faecalis*'e (MIC=1.25 mg/mL) karşı en yüksek antimikrobiyal etkinliği göstermiş olup, *A. rubescens*, *C. cibarius* ve *R. cyanoxantha* türlerinin her iki ekstresindeki antimikrobiyal etkinlik seviyelerinin birbirlerine yakın olduğu rapor edilmiştir.

Moglad ve Saadabi [108], *Agaricus bernardii*, *Agaricus arvensis*, *A. bisporus*, *Agaricus porphyrocephalus* F.H. Möller, *Agaricus silvicola* (Vittad.) Peck, *Coprinus comatus* (Vittad.) Peck ve *Lepiota cristata* (Bolton) P. Kumm. yabani mantar türlerinin su, etanol ve petrol eteri ekstrelerin farklı bakteri ve mantara karşı antimikrobiyal kabiliyetlerini araştırmışlar ve etanolün, antimikrobiyal bileşenleri elde edebilmek için ideal bir solvent olacağı kanısına varmışlardır. Ayrıca, çalışmada *A. porphyrocephalus*'un etanolik ekstresinin, diğer türlerle karşılaştırıldığında bütün mikroorganizmalara

karşı en iyi antimikrobiyal etkinlik sergileyen tür olduğu ve *A. porphyrocephalus*, *A. bernardii* ve *C. comatus* türlerinin, petrol eter *ekstrelerinin* *E. coli*'ye karşı etkili oldukları rapor edilmiştir.

Hussein ve ark. [109], *A. bisporus*'un (50 mg/mL) sulu ve etanol *ekstrelerinin* *Salmonella typhi* ve *S. aureus* bakterinin gelişimlerine karşı etkisini incelemişler ve iki bakteri türünde sulu mantar *ekstrelerinden* etkilenmediği, ancak etanollü mantar *ekstrelerinin* *S. aureus* (15 mm) ve *S. typhi* (9 mm)'ye karşı iyi bir aktivite sergilediğini öne sürmüşlerdir. Waqas ve ark. [110], *A. bisporus*'un etil asetat ekstresinde *Drechslera australiensis* fungusunun gelişiminde %50 oranında azalma sağladığını, *Alternaria alternata* ve *Fusarium oxysporum* türlerinin gelişimini ise %44 oranında engellediğini öne sürmüşlerdir.

Casari ve ark. [111], farklı yetiştirme ortamların *L. edodes*'in dört izolatının (FV11 (Le1), UFV52, UFV62 ve UFV63) antimikrobiyal özelliklerine etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında, farklı ortamlarda yetiştirilen ve farklı yöntemlerle ekstre edilen *L. edodes* izolatlarının hepsinin antimikrobiyal etkinlik sergilediğini rapor etmişlerdir.

Heleno ve ark. [112], *Volvopluteus gloiocephalus* (DC.) Vizzini ve *Clitocybe subconnexa* Murrill'in, antibiyotik ilaç türlerinden olan ampisilin ve streptomisinden daha fazla antibakteriyel etkinliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada ayrıca, *V. gloiocephalus*'un fenolik ekstraktına en hassas olan bakteri türünün *S. aureus* olduğu belirlenmiş ve *V. gloiocephalus*'un fenolik *ekstrelerinin* sindirilmiş numunelerde daha iyi antifungal etkinlik sergilediği belirtilmiştir. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlara göre, bütün örneklerin ketokonazolden ve bifonazolden daha iyi antifungal etkinliğe sahip olduğunu öne sürmüşlerdir.

Chowdhury ve ark. [113], *P. ostreotus*, *L. edodes* ve *Hypsizygus tessellatus* (Bull. ex Fr.) Singer türlerinin antimikrobiyal etkinliklerini belirledikleri çalışmalarında, *P. ostreotus*'un birçok bakteri ve mantar türüne karşı etkili olurken, *L. edodes*'in en iyi antibakteriyel etkinliğe sahip olduğunu, *P. ostreotus* ve *H. tessellatus*'un, *B. subtilis*'e karşı güçlü bir antibakteriyel aktivite sergilediğini belirtmişlerdir.

Stanley ve ark. [114], *Pleurotus tuberregium*'un etanol *ekstrelerinin*, *Klebsiella* spp. (21±0.2 mm); *Bacillus* spp. (15 ± 0.4 mm); *S. aureus* (13 ± 0.2 mm); *Candida albicans* (7 ± 0.1 mm) türlerinin gelişmelerini önleyici bir etkide bulunduğunu bildirmiştir. *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus* spp.'nin ise mantarın etanol ekstresine karşı direnç gösterdiğini vurgulamışlardır.

Al-Faqeeh ve ark. [115], *H. ulmarius* (Bull) şapkalarının metanolik *ekstrelerinin* *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *E. faecalis* ve *K. pneumoniae* bakterilerine karşı maksimum seviyede etkinlik sergilediğini bildirmişlerdir. Çalışmada bu mantarın etil asetat fraksiyonunun *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* bakterilerine; petrol eteri fraksiyonunun ise *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* ve *E. coli*'ye karşı güçlü bir antibakteriyel etki gösterdiğini saptanmıştır.

Mantarların Antihiperlipidemik Etkileri

Kandaki yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve toplam kolesterol (TC) değerlerinin yüksek seviyelerde seyretmesi kardiovasküler hastalıklar için yüksek risk oluşturmaktadır.

Lovastatin, diyet yolu ile vücuda alınabilen ve kolesterolün üretimini önleyerek kandaki kolesterol seviyesinin azalmasına yardımcı olan bir bileşiktir. Doğal lovastatin benzeri bir bileşik içeren *P. ostreatus* ile fareler ve insanlar üzerinde kolesterol düşürücü etkileri olduğunu gösteren birçok araştırma mevcuttur. Dong ve ark. [116], *P. ostreatus* polisakkaritlerinin (400 mg/kg vücut ağırlığı (va)) aterojenik indeksi iyileştirdiğini ayrıca heptatik miyeloperoksidaz, serbest yağ asidi, TC, trigliserit (TG) ve adiponektin değerlerini azalttığını bildirmişlerdir. Ayrıca bu polisakkaritlerin karaciğer enzim etkinliklerini ve MDA içeriğini yok ederek alkalın fosfataz (ALP), alamin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve LDL-C değerlerini düşürdüğünü, diğer taraftan serum HDL-C değerinde ise artışa sebep olduğunu vurgulamışlardır. Nwobi ve ark. [117], hiperlipidemik sıçanlarda *P. osteratus* ile tedavinin lipit seviyelerini (TC %14.38, TG %15.82, LDL %25.52, VLDL% 15.83) aterojenik indeksleri (TC/HDL %28.89, LDL/HDL %20.24, Log (TG/HDL) %27.27) önemli oranda azalttığını rapor etmişlerdir. Ayrıca çalışmada, tedavi edilen canlıların vücut ağırlıklarında %19.59 oranında azalma gözlemlendiği, HDL-C değerinde ise önemli bir değişikliğe rastlanmadığı bildirilmiştir. Piskov ve ark. [118]'nin, kurutma yöntemlerinin *P. osteratus*'un hipolidemik potansiyeli üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmanın sonuçlarına göre, dondurarak kurutma yönteminin statin içeriği ve hipolidemik potansiyeli için önemli olan antioksidan kabiliyetlerinin korunması bakımından en elverişli yöntem olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, dondurularak kurutulmuş bir örnekteki lovastatin miktarının (342 ± 9.0 mg/kg) kuru hava yöntemi (190 ± 6.0 mg/kg) ile kurutulan örnekten çok daha yüksek bir değere sahip olduğunu vurgulamışlardır. Ravi ve ark. [15], *P. ostreatus* ekstrelerinin alloxan diyabetli farelerin vücut ağırlıklarında, kan şekere değerlerinde, LDL ve VLDL kolestrol değerlerinde kontrol grubuna göre önemli ölçüde bir azalma gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Çalışmada, *P. ostreatus* ekstresi uygulanan grupta HDL değerlerinde artış gözlemlenirken (59.4 ± 8.8 mg/dL), kontrol grubunun değerlerinde (37.4 ± 5.2 mg/dL) önemli düzeyde azalma gözlemlendiği rapor edilmiştir. Schneider ve ark. [16], *P. ostreatus*'un insanlar üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmalarında elde ettikleri sonuçların daha önce canlı hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarla uyum içerisinde olduğunu vurgulayarak, *P. ostreatus*'un insanlarda lipit profilleri üzerinde iyileştirici bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca *P. ostreatus* tüketiminin insanlarda TG, TC ve oksidize LDL (oksLDL) konsantrasyonları üzerinde olumlu etki yaptığını öne sürmüşlerdir.

Krisin'de, *P. ostreatus*'un ana bileşenlerindedir. Anandhi ve ark. [119], *P. ostreatus* ekstresi (500 mg/kg va) ve Krisin (200 mg/kg va) uygulaması sonucunda hiperkolesterolemik canlılarda ortalama glukozun kan/serum seviyelerinde, lipit profil parametreleri ve hepatik markör enzim

değerlerinde önemli seviyede bir azalma gözlemlendiğini vurgulamışlardır. Çalışmada, Krisin'in lipit düşürücü etkisinin lovastatin (10 mg/kg va)'den daha kuvvetli olabileceği öne sürülmüştür.

Jeong ve ark. [120], *A. bisporus* tozunun (200 mg/kg va) diyabetik sıçanların, plazma glukoz oranında %24.7 ve TG konsantrasyonunda %39.1 oranında azalma sağladığını, ayrıca karaciğer enzimlerinden ALT'nin etkinliğini %11.7 ve AST'nin etkililiğini %15.7 oranında artırdığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, uygulama sonucu hiperkolesterolemik canlılarda plazma TC'de %22.8, LDL'de %33.1, hepatik kolesterol konsantrasyonlarında %36.2 oranında düşüş yaşandığını bildirilirken, TG konsantrasyonunda %20.8 düzeyinde azalma gerçekleştiği belirtilmiştir. Priya ve Chellaram [121], *A. bisporus* metanol ekstresi verilen sıçanların kolesterol değerlerinin 107.0 ± 1.26 mg/dl ve TG değerlerinin 227 ± 1.1 mg/dl olduğunu belirlemişlerdir. Kontrol grubundaki sıçanların kolesterol (70.0 ± 1.07 mg/dl) ve TG değerleri (193.0 ± 1.24 mg/dl) yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanların değerleri (kolesterol değeri 128.4 ± 1.03 mg/dl ve TG değeri 272.6 ± 1.22 mg/dl) ile karıştırıldığında *A. bisporus* ekstresiyle tedavi edilen grubun daha düşük değerler sergilediği gözlemlenmiştir. Balakrishnan ve Loganayagi [122], *A. bisporus*'un etanol ve metanol ekstrelerinin kontrol grubuna göre yüksek TG, kolesterol ve fosfolipit değerlerine sahip olan diyabetik sıçanlara uygulaması ile bu değerlerin kontrol grubu ile neredeyse aynı seviyelere getirebileceğini rapor etmişlerdir.

Kała ve ark. [123], tarafından yürütülen bir çalışmada mantar şapkalarının metanol ekstrelerinde en yüksek lovastatin içeriğine sahip türün *Cantharellus cibarius* Fr. (67.89 mg/100 g kuru ağırlık) olduğunu en düşük içeriğe ise *L. edodes*'in (0.95 mg/100 g kuru ağırlık) sahip olduğunu (*C. cibarius*>*A. bisporus*>*I. badia*>*L. edodes*) in vitro miselyum kültürlerinin metanol ekstrelerinde ise en yüksek lovastatin içeriğinde sahip türün *A. bisporus* (47.96 mg/100 g kuru ağırlık), en düşük içeriğe sahip türün ise *L. edodes* (3.48 mg/100 g kuru ağırlık) (*A. bisporus*>*C. cibarius*>*I. badia*> *L. edodes* olduğu bildirilmiştir). Ayrıca çalışmada, suni mide özsuyu ve tükrük çözeltisinde in vitro kültürlerin *A. bisporus* türü hariç diğer örneklerin lovastatin miktarlarının 0.1 mg/100 g kuru ağırlık değerinde olduğu ve en yüksek lovastatin içeriğine sahip türün 0.51 mg/100 g kuru ağırlık değeri ile *L. edodes* olduğu bildirilmiştir.

Chen ve ark. [124], *P. eryngii* polisakkaritlerinin (PEPE), yüksek yağ ile uyarılmış farelerde hiperlipidemiye etkili bir düzeyde önlediğini bildirmişlerdir. PEPE, ayrıca LDL-C), TG ve TC seviyelerinde önemli oranda azalmaya HDL-C seviyesinde anlamlı bir artışa sebep olmuştur. Çalışma sonuçlarına göre, PEPE'nin karaciğer dokusunda meydana gelen fazla lipit oluşumunu güçlü şekilde inhibe edebileceği öne sürülmüştür. Yine Chen ve ark. [125]'nin yaptıkları bir çalışmada PEPE'nin diyabetik canlılara verilmesi neticesinde; TC, TG ve LDL-C seviyelerinde azalma gözlenirken, HDL-C seviyesinde önemli bir artış gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Xu ve ark. [126], in vivo çalışmalarında *P. eryngii* var. *tuoliensis*'in asidik (AcMZPS) ve alkalik ekstre edilebilir polisakkaritlerinin (AlMZPS) başta TG olmak üzere TC, alkalik fosfataz, alamin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, MDA,

lipit peroksidasyonu, LDL-C ve VLDL-C oranlarını belirli bir seviyede düşürdüğünü vurgulamışlardır. HDL-C değeri başta olmak üzere SOD, GSH-Px, CAT ve serum lipit/karaciğer homojenat değerlerinin önemli miktarda yükseldiğini bildirerek *P. eryngii* var. *tuoliensis*'in potansiyel hepatoprotektif etkilerinin var olduğunu öne sürmüşlerdir. Zhang ve ark. [127], çalışmalarında *P. eryngii*'den izole edilen ekopolisakkaritler (EPS), ezimatik ekopolisakkaritler (EEPS) ve asidik ekopolisakkaritlerin (AEPS) farklı dozlarda uygulanmasıyla, hiperlipidemik canlılar üzerinde 20 günün sonunda vücut ağırlıklarında azalmaya sebep olabileceğini rapor etmişlerdir. 800 mg/kg ve AEPS (H-AEPS) uygulamasının ardından, TG değeri 1.65 ± 0.21 mM, TC değeri 2.29 ± 0.06 mM ve LDL-C değerinin 0.61 ± 0.02 mM olduğunu bildirmişlerdir. EPS'de TG değerinin 1.80 ± 0.15 mM, TC 2.89 ± 0.13 mM ve LDL-C 0.62 ± 0.03 mM değerlerinde olduğunu belirlenirken, EEPS'nin ise TG 1.99 ± 0.16 mM, TC 3.41 ± 0.21 mM ve LDL-C değerlerinin 0.81 ± 0.05 mM ile en yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, çalışmada HDL-C değerleri bakımından AEPS'nin 1.92 ± 0.14 mM ile en yüksek değere sahip olduğu, EEPS'nin 1.65 ± 0.12 mM ve EPS'nin 1.82 ± 0.05 mM değerlerine sahip olduğunu vurgulanmıştır. Zhang ve ark. [128]'nin, *P. eryngii*'den elde edilen SI-04 (EPS-1 ve EPS-2) polisakkaritlerin canlılara uygulamasının TC, TG, VLDL-C ve LDL-C seviyelerinin azalmasında, HDL-C seviyesinin ise artmasında etkili bir rol oynadığını bildirmişlerdir.

Sarker [129], *G. lucidum*'un petrol eteri ve metanol ekstraktlarını farklı dozlarda diyabetik sıçanlara uygulamış ve TC, TG ve LDL-C değerlerinde önemli bir oranda azalma ve HDL-C değerlerinde bir yükselme gözlemlediğini bildirmiştir. Meneses ve ark. [130], *G. lucidum* ekstrelerinin (GI-1 ve GI-2), lipit metabolizması üzerinde bazı durumlarda simvastatinden (lipit düşürücü bir ilaç) daha kuvvetli bir etki sergilediğini öne sürmüşlerdir. Çalışma sonuçlarına göre, GI-1 ve GI-2 ekstrelerinin düşük ve yüksek dozları karaciğerde lipit birikmesini büyük ölçüde engellemektedir. Xu ve ark. [131], indirgenmiş *G. lucidum* polisakkaritlerinin, ateroskleroz indeks, TC, TG, LDL-C ve HDL-C değerleri üzerinde *G. lucidum* polisakkaritlerinden daha güçlü bir etkinliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. Li ve ark. [132], *G. lucidum* polisakkaritleri-krom (III) [GLP-Cr (III)] kompleksi verilen farelerin TC, TG, LDL-C değerlerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğunu, açlık kan şekerleri ve glukoz toleranslarının da düşük bulunduğunu öne sürmüşlerdir.

Wang ve ark. [133], *C. militaris* SU-12'nin rezidü polisakkariti (RPS)'nin yapısını analiz etmişler ve bunun lipit metabolizması ile oksidatif stres üzerindeki farmakolojik etkilerini araştırmışlardır. RPS'nin kan ve karaciğer lipit seviyelerini azaltabildiğini, glutamat piruvat transaminaz ve antioksidan aktiviteyi geliştirebileceğini belirlemişlerdir. Ayrıca, fare karaciğerlerinde yapılan histopatolojik gözlemler sonucunda, RPS'nin karaciğer hücresi hasarını hafifletebileceği gözlenmiştir. Araştırmacılar bu sonuçlara dayanarak, RPS'nin potansiyel bir antihiperlipidemik, hepatoprotektif ve antioksidan ürün olarak kullanılabilirliğini öne sürmüşlerdir. Liu ve ark. [134], ile *Cordyceps taii* polisakkaritleri verilen

diyabetik fare grubunun TC'nde %13.84 oranında, TG'de %31.87 ve LDL-C'de %36.61 oranında azalma, HDL-C seviyesinde ise %28.60 oranında artış gözlemlendiğini belirtmişlerdir.

Yoon ve ark. [135], hiperkolesterolemili sıçanlara *L. edodes* mantarının diyet takviyesi olarak uygulaması sonucunda sıçanların vücut ağırlıklarında anlamlı bir azalma gözlemlendiğini bildirmiştir. %5 *L. edodes* diyet takviyesi ile beslenen hiperkolesteremik sıçanlar, plazma toplam kolesterolünde %34.33, TG'de %53.21, LDL'de %75, toplam lipitte %34.66, fosfolipitte %25.73 ve LDL/HDL değerlerinde %71.43 oranında bir azalma gözlemlendiğini öne sürmüşler ve elde edilen bu sonuçlara göre *L. edodes*'in doğal bir kolesterol düşürücü etkiye sahip olabileceğini vurgulamışlardır. *L. edodes*'in sahip olduğu eritadenin bileşeni, kolesterol seviyesinin azaltmakla birlikte özellikle plazma kolesterol konsantrasyonunu düşürücü bir etkiye de sahiptir. Yang ve ark. [136], yüksek yağlı diyet tüketiminin sebep olduğu toplam serum kolesterol (T-CHO), LDL ve TG değerlerinin yükselmesini, eritadenin (10mg/kg) ve farklı dozlarla muamele edilen *L. edodes* (%5, %10 ve %20) diyet takviyesi ile bu değerlerin artışı hafiflettiğini ve eritadenin ve *L. edodes* tedavisi ile karaciğer dokularında meydana gelen lipit birikiminde azalma gözlemlendiğini öne sürmüşlerdir.

Mantarların Antidiyabetik Etkileri

Diyabet, bireyin kan şekerinin yüksek seviyelerde olması, vücudun ürettiği insüline hücrelerinin tepki verememesi veya hiç üretememesi ile oluşan metabolik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Zhang ve ark. [137], streptozotosin ile uyarılan diyabetik sıçanların tedavisinde *P. ostreatus* polisakkaritlerini kullanmışlar; bu polisakkaritlerin, hiperlipidemi ve hiperglisemi seviyelerinde azalma gösterdiğini, insülin direncini düzenlediğini ve glikojen depolamasını artırdığını rapor etmişlerdir. Ayrıca CAT, SOD ve GSH-Pxetkinliklerini aktifleştirdiğini, bunun yanı sıra MDA değerini azaltarak Tip-2 diyabetik sıçanlarda oksidatif hasar riskini en az seviyeye düşürdüğünü bildirmişlerdir.

Pandimeena ve ark. [138], 100g kurutulmuş *P. florida* örneğinde 61.85 mg (katekol eşdeğeri) fenol, 1.92 mg alkaloid, 2.78 g flavonoid ve çok az miktarlarda tanenler, glukozitler, terpenoidler ve saponinleri bulundurduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada *P. florida* metanol ekstraktlarının 0.25 mg α -amilaz konsantrasyonda %13.78, 0.50 mg konsantrasyonda %20.7 ve 1 mg konsantrasyonda %26.5 oranında antidiyabetik etkinlik sergilediği belirtilmiştir. Khatun ve ark. [139], diyabetik sıçanlara *P. florida* (%5 ağırlık/ağırlık kuru toz) verilmesinin ardından kan şekeri ve kolesterol seviyelerinde önemli derecede azalma sağlandığını ve *P. florida* ile beslenen diyabetik grubun, kontrol grubuna göre daha düşük LDL değerine sahip olduğunu öne sürmüşlerdir.

Balaji ve ark. [140], çalışmalarında *P. pulmonarius* misellerinin sıcak su ve aseton ekstraktlarını diyabetik albino sıçanlara uygulamışlar ve sıcak su ekstraktlarının aseton ekstresine göre daha yüksek antidiyabetik etkinliğe sahip olduğunu belirlemişlerdir. Sıcak su ekstresinin glukoz seviyesinde anlamlı derecede azalma sağladığı ve bunların yanı sıra diyabet kaynaklı komplikasyonlarda koruyucu etki sergilediği vurgulanmıştır.

Ng ve ark. [141], *P. sajor-caju*'nun hipoglisemik ve antidiyabetik aktivitelerini analiz etmek için mantarın sulu ekstratlarını tek bir doz olarak 500, 750 veya 1000 mg/kg dozlarında sıçanlara uygulamış ve oral glukoz tolerans testinde, 750 mg/kg'lık doz uygulamasından 3 saat sonra, normal sıçanların kan şekerinde %41.3, diyabetik sıçanlarda %36.5 oranında azalma gözlemlendiği bildirilmiştir.

Etewa ve ark. [142], *P. ostreatus* ve *A. bisporus* türlerinin antidiyabetik etkinliklerini araştırdıkları çalışmalarında, her iki türün de iyi bir düzeyde hipoglisemik etkiye sahip olduğu, deneklerin hepatik glikojen içeriğinde ve glukokinaz ekspresyon değerlerinde anlamlı bir seviyede yükselme olduğunu belirlemişlerdir. Kumar ve ark. [143], *A. bisporus* polisakkaritlerinin *in vitro* antidiyabetik etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, polisakkaritlerin 2 mg/mL konsantrasyonda, %78.85 diyabet engelleyici etkinlik sergilediğini bildirmişlerdir (α -amilaz inhibitörü). Zaid ve ark. [144], streptozotosin ile uyarılan sıçanlara *A. bisporus* verilmesinin ardından, glukoz konsantrasyonunda anlamlı bir yükseliş gösterdiğini ve aynı zamanda glukoz 6 fosfat dehidrogenaz (G6PD) etkinliğinde ve insülin seviyesinin önemli derecede azalma gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Balakrishnan ve Loganayagi [145], *A. bisporus* şapkalarının etanol ve metanolekstratlarında, alloksan ile uyarılan sıçanların hipoglisemik etkinliklerini değerlendirmişler ve etanol ekstresi ile en iyi sonuçlara ulaşıldığını belirtmişlerdir. Alloksan ile uyarılan diyabetik grup, normal grup ile karşılaştırıldığında serum glukoz değerlerinde, işaretleyici enzimlerde (AST, ALT, ALP, laktat dehidrojenaz (LDH)) ve lipit seviyelerinde anlamlı bir artış gösterdiğini, serum protein ve karaciğer glikojen içeriklerinde ise önemli seviyede azalma sergilendiğini bildirmişlerdir.

Kim ve ark. [146], normal beslenen farelerin kan şeker seviyesi 200-210 mg/dl iken, streptozotosin ile uyarılan farelerin kan şeker seviyelerinin 6. günde 346 mg/dl ve 12. günde 424 mg/dl değerlerinde olduğunu ve farelere 30 mg/kg *Phellinus linteus* polisakkariti verilmesinin kan şeker seviyesinin azalmasına etki etmediğini bildirmişlerdir. Ancak, kontrol grubundan elde edilen adacık hücrelerin birçoğunda önemli boyutta lenfosit sızması belirlenmiş, polisakkarit verilen grupta ise kontrol grubunun aksine sızmanın azaldığını bildirilmiştir. Ayrıca, ortalama insülin direnç indekslerine bakıldığında kontrol grubunda 3.1 ± 0.4 değerinde iken, polisakkaritle muamele gören grupta 0.69 ± 0.04 değerlerinde olduğu gözlenmiştir.

Zhang ve ark. [147], *Suillus luridus*'tan izole ettikleri polisakkaritleri (Suilu.A, Suilu.C ve Suilu.S) streptozotosin ile uyarılan diyabetik farelere uygulamışlar ve uygulama yapılan farelerin vücut ağırlıklarında kontrol grubuna kıyasla azalma gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Çalışmada, kan şeker seviyesi bakımından üç polisakkarit ile tedavi edilen grubun normal seviyeye yaklaştığını ancak çok azında kontrol grubuna kıyasla yüksek seviyelerde olduğunu gözlemlemiştir. Ayrıca tedavi edilen grubun, karaciğer ve böbrek hasarına karşı olumlu etki sergilediğini öne sürülmüş ve özellikle Suilu.C'nun diyabetik farelerde karaciğerin korunmasına en etkili olan polisakkarit olduğunu rapor etmişlerdir.

Tip-2 diyabet tedavisinde, kompleks karbonhidratların ve disakkaritlerin bağırsaktan emilebilir monosakkaritlere parçalanmasının, α -glukozidaz enziminin bloke edilerek engellenmesi etkili yöntemlerden bir tanesidir. Stojkovic ve ark. [148], tıbbi mantar türlerine ait *Agaricus blazei* Murrill, *Coprinus comatus* Pers., *Cordyceps militaris* Fr., *Inonotus obliquus* Pilát, *Morchella conica* Pers. ve *Phellinus linteus* Berk'in *in vitro* antidiyabetik aktivileri ile ilgili yürüttükleri çalışmada, *M. conica* ve *C. militaris* türlerinin metanolik ekstralarının, α -amilaz enzim etkinliğini inhibe edemediğini, fakat *I. obliquus*'un metanolik ekstresinin α -glukozidaz enziminin en kuvvetli inhibitörü olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca çalışmada, *C. comatus*'un α -amilaz enziminin inhibasyonunda güçlü bir etki gösterdiği de öne sürülmüştür.

Vincent ve ark. [149], yüksek yağlı diyet ile beslenen canlı grubunu *Agaricus blazei* ile tedavi etmişler ve *A. blazei*'nin, vücut ağırlığının artışı önleyerek yağ kütlesi oluşumuna karşı koruma sağladığı, bunun dışında yüksek yağlı beslenme sonucu oluşan iltihaplanma, glukoz intoleransı, insülin direnci gibi durumlara karşı da koruma sağladığını rapor etmişlerdir.

Chen ve ark. [150] yaptıkları bir çalışmada, PEPE'nin diyabetik canlılara verilmesi neticesinde vücut ağırlıklarında anlamlı bir azalma gözlediklerini belirtmişlerdir.

Oluba ve ark. [151], streptozotosin ile uyarılan diyabetik sıçanların tedavisinde kullanılan *G. lucidum* ekstralarının doza bağımlı olarak sağlıklı ve diyabetik canlılarda insülin seviyesini yükselttiğini ve lipid profilini iyileştirdiğini gözlemlemişlerdir. Ma ve ark. [152], *G. lucidum* triterpenoitleri, polisakkaritleri, proteoglikanları ve proteinleri gibi farklı moleküllerin diyabet engelleyici aktivite sergilediğini belirtmişlerdir. Ayrıca bu moleküllerin, bağışıklık tepkilerini düzenleyebildiğini, kan şekerinin de yükselmesini önlediğini vurgulamışlardır. Aynı çalışmada *G. lucidum*'dan elde edilen Ling Zhi-8 proteinin lenfosit sızmasını önemli derecede azalttığı ve bu proteinin aynı zamanda diyabetik farelerde insülin antikor tespitini yükselttiğini öne sürmüşlerdir. Xiao ve ark. [153], *G. lucidum*'dan izole edilen F-31 polisakkariti verilen farelerin açlık serum insülinlerinin, kontrol grubundakilere göre önemli düzeyde düşük bulunduğunu bildirmişlerdir. Vücut ağırlıkları bakımından iki grup arasında önemli bir fark gözlemlenmediğini belirtilirken, epididimal yağ/vücut ağırlığı oranının, F-31 polisakkariti verilen grupta daha yüksek olduğu ve bu polisakkaritin diyabetten dolayı oluşan hepatik hasarı azalttığı öne sürülmüştür. Li ve ark. [130], *G. lucidum*'dan izole edilen GLP-Cr (3) bileşeninin çok iyi seviyede hipoglisemik ve lipolipidemik etkinlik sergilediğini bildirmişlerdir. Çalışmada, açlık kan şekeri bakımından GLP-Cr (3) ve GLP bileşenleri karşılaştırıldığında, GLP-Cr (3) bileşeninin etkisinin daha fazla olduğu ve GLP-Cr (3), GLP ve CrCl₃ gruplarındaki canlıların tümünde glukoz toleransının önemli seviyede azaldığı vurgulanmıştır. Ayrıca, tedavilerde GLP-Cr (3) bileşeninin (50 mg/kg/gün) kullanılmasının, glukoz toleransının sağlıklı canlılarla aynı değere getirilmesinde etkili olduğu öne sürülmüştür.

Guo ve ark. [154], benzer çalışmayı *Grifola frondosa*'dan izole ettikleri GFP-Cr (3) polisakariti ile yürütmüşler ve GFP-Cr (3) bileşeninin (300 mg/kg/gün), GFP (300 mg/kg/gün) bileşeni ile karşılaştırıldığında diyabetik canlılardaki kan glukoz değerlerini önemli düzeyde azalttığını bildirmişlerdir. Çalışmada, GFP ve GFP-Cr (3) bilenlerinin yüksek dozda uygulanması halinde diyabetik canlılarda hepatik glikojen değerinin önemli düzeyde yükselttiği gözlenmiştir. Kou ve ark. [155], *G. frondosa* polisakaritleri verilen diyabetik sıçanların, vücut ağırlıklarında önemli düzeyde azalma olduğunu gözlemlemişler ve bu polisakaritlerin açlık kan şeker seviyelerini büyük bir ölçüde baskıladığını vurgulamışlardır. Hipogliseminin, diyabet hastalarında böbrek hasarına neden olduğu bilinmektedir. Çalışmada, *G. frondosa* polisakaritleri, diyabetik canlıların böbreğinde meydana gelen patolojik farklılıklar üzerinde de olumlu sonuçlar yaratmıştır. Chen ve ark. [156], *G. frondosa*'dan elde edilen GFP-W adlı heteropolisakaritin glukoz emilimini yükselttiğini bildirirken, Tip-2 diyabetik canlılarda kan glukoz seviyesi ve glukoz toleransını önemli seviyede düzenlediğini belirtmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre GFP-W'nin, glukoz metabolizma düzensizliğinin tedavisinde kullanılabilecek potansiyele sahip olduğu vurgulanmıştır.

Meera ve ark. [157], *H. ulmarius* ekstresinin, streptozotosin-nikotinamid ile uyarılan diyabetik canlıların tedavisinde kullanmışlar ve iki glukonejenik enzim olan glukoz-6-fosfataz ve fruktoz-1,6-bisfosfataz'ın dokulardaki etkinliği ve serum glukoz seviyesi üzerinde yükselme gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Çalışmada *H. ulmarius* sulu ekstresinin, glukoz, serum ve dokulardaki AST, ALT, ALP ve LDH enzimlerini normal değerlerde olmasını sağlayarak streptozotosinin meydana getirdiği hasarlara karşı olumlu etki yaptığını ve glukoneojenik enzimlerin etkinliğini normal değerlere getirdiğini belirtmişlerdir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Farklı mantar türleri üzerinde yapılan çalışmalar, mantarlardan elde edilen ana biyoaktif bileşiklerin çeşitli hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde büyük bir potansiyele sahip olduklarını göstermektedir. Ayrıca bağışıklık sisteminin güçlenmesinde aktif olan bu bileşikler çeşitli fonksiyonel gıdaların geliştirilmesinde etkili bir malzeme olarak kullanılabilirler. Ancak mantarlar polisakaritler, antioksidanlar, amino asitler gibi biyoaktif içerik dışında çok farklı içeriklere de sahiptir. Bu nedenle mantarlar tüketilirken/tüketilmesi planlanırken bu durumun göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Ayrıca kronik rahatsızlığı nedeni ile ilaç kullananların, kemoterapi uygulanan hastaların bu mantarları ve bunlara ait preparatları doktorlarına danışmadan kesinlikle kullanmamalıdır.

Mantarların biyoaktif bileşenlerin içeriği ve oranları, yetiştirme ortamlarına, iklimsel faktörlere, olgunluk durumlarına bağlı olarak büyük farklılıklar gösterebilmektedir. Bu nedenle farmasötik uygulamalar için kullanılacak mantar ürünlerinin kalitesini ve etkinliğini garanti etmek için onaylanmış standart üretim protokollerine ihtiyaç duyulabileceği göz önünde bulundurulması gereken durumlardan

bir tanesidir. Diğer taraftan, mantarların yetiştiriciliğinde uygulanan sıcaklık ve nem gibi faktörler, zararlı fungus türleri, bakteriler ve zararlıların gelişimleri için optimum şartları sağlar. Bu nedenle mantar üretiminde sıklıkla yaşanan hastalık ve zararlılarla ilgili problemlerin çözümü için yoğun pestisit kullanımı yaygındır. Bu pestisitlerin insan sağlığına olan olumsuz etkileri göz önüne alındığında, özellikle tıbbi amaçlarla kullanılacak olan mantarların üretiminde organik tarım ya da iyi tarım uygulamaları gibi kontrollü ve sertifikalı üretim sistemlerinin uygulanması tercih edilmelidir. Bu konudaki bir diğer çözüm önerisi ise farmasötik uygulamalar için biyoaktif metabolitler üretmek üzere mantar şapkaları yerine sıvı misel kültürü kullanılmasıdır. Mantar misellerinin biyoaktif içerik bakımından çok zengin oldukları bilinmektedir. Sıvı misel kültürü üretiminde kimyasal kullanmadan misel üretimi yapmak mümkün olabileceği gibi, bu üretim şeklini standartlara oturtmak da çok daha kolay olacaktır.

Sonuç olarak, mantarlar sağlıklı beslenme ve çeşitli hastalıkların tedavisinde ümit verici sonuçlar sunarken, tıbbi özelliklere sahip olan mantar türlerinin sahip oldukları biyoaktif içerikler ve bunların etkileri hakkında daha fazla bilgi gereklidir. Ancak bu bilgiler elde edildikten sonra, olumsuz sonuçlara yol açmadan mantarlardan maksimum fayda elde etmek daha mümkün olacaktır. Yüksek kaliteli klinik çalışmaların gerçekleştirilmesi ve yayınlanması, standart kalitede yüksek kaliteli ürünler üretilmesi ve kontrollü koşullar altında sürdürülebilir üretimin sağlanması konu ile ilgili en önemli hedefler olarak belirlenmelidir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: *F.A.*; Tasarım: *C.Ö., F.A.*; Denetim: *C.Ö.*; Kaynaklar: -; Malzemeler: -; Veri toplama ve/veya işleme: -; Analiz ve/veya yorumlama: *C.Ö., F.A.*; Literatür taraması: *C.Ö., F.A.*; Makalenin yazılması: *C.Ö., F.A.*; Kritik inceleme: *C.Ö., F.A.*; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Miles, P.G., Chang, S.T. (2004). Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. CRC press, p.6.
2. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2018). <http://www.fao.org/home/en>

3. Dembitsky, V.M., Terent'ev, A.O., Levitsky, D.O. (2010). Amino and fatty acids of wild edible mushrooms of the genus *Boletus*. *Records of Natural Products*, 4(4), 218-223.
4. Sevindik, M. (2018). Investigation of oxidant and antioxidant status of edible mushroom *Clavariadelphus truncatus*. *Mantar Dergisi/The Journal of Fungus*, 9(2), 165-168.
5. Reis, F.S., Martins, A., Barros, L., Ferreira, I.C. (2012). Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between in vivo and in vitro samples. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1201-1207.
6. Ghahremani-Majd, H., Dashti, F. (2015). Chemical composition and antioxidant properties of cultivated button mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 56(3), 376-382.
7. Manzi, P., Aguzzi, A., Pizzoferrato, L. (2001). Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry*, 73(3), 321-325.
8. Wada, T., Sumardika, I. W., Saito, S., Ruma, I. M. W., Kondo, E., Shibukawa, M., Sakaguchi, M. (2017). Identification of a novel component leading to anti-tumor activity besides the major ingredient cordycepin in *Cordyceps militaris* extract. *Journal of Chromatography B*, 1061, 209-219.
9. Qu, L., Li, S., Zhuo, Y., Chen, J., Qin, X., Guo, G. (2017). Anticancer effect of triterpenes from *Ganoderma lucidum* in human prostate cancer cells. *Oncology Letters*, 14(6), 7467-7472.
10. Wang, X., Sun, D., Tai, J., Wang, L. (2017). Ganoderic acid A inhibits proliferation and invasion, and promotes apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Molecular Medicine Reports*, 16(4), 3894-3900.
11. Thongbai, B., Rapior, S., Hyde, K.D., Wittstein, K., Sadler, M. (2015). *Hericium erinaceus*, an amazing medicinal mushroom. *Mycological Progress*, 14(91),1-23.
12. Salmons W. (2017). Medicinal Properties and Clinical Effects of Medicinal Mushrooms Zied D.C ve Pardo-Giménez A. (Eds.), *Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications*, Wiley Blackwell, England, p.504.
13. Ferreira, C.F.R., Vaz J.A., Vasconcelos, M. H., Martins, A.R.L. (2010). Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 10(5), 424-436.
14. Ferreira, I. C., Heleno, S. A., Reis, F. S., Stojkovic, D., Queiroz, M. J. R., Vasconcelos, M. H., Sokovic, M. (2015). Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities. *Phytochemistry*, 114, 38-55.
15. Ravi, B., Renitta, R. E., Prabha, M. L., Issac, R., Naidu, S. (2013). Evaluation of antidiabetic potential of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in alloxan-induced diabetic mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 35(1), 101-109.
16. Schneider, I., Kressel, G., Meyer, A., Krings, U., Berger, R. G., Hahn, A. (2011). Lipid lowering effects of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in humans. *Journal of Functional Foods*, 3(1), 17-24.

17. Lim, W.Z., Cheng, P.G., Abdulrahman, A.Y., Teoh, T.C. (2020) The identification of active compounds in *Ganoderma lucidum* var. *antler* extract inhibiting dengue virus serine protease and its computational studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38(14), 4273-4288.
18. Kosanic, M., Rankovic, B., Dasic, M. (2013). Antioxidant and antimicrobial properties of mushrooms. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 19(5), 1040-1046.
19. Wang, Q., Wang, F., Xu, Z., & Ding, Z. (2017). Bioactive mushroom polysaccharides: a review on monosaccharide composition, biosynthesis and regulation. *Molecules*, 22(6): 955, 1-13.
20. Aleem, E. (2013). β -Glucans and their applications in cancer therapy: focus on human studies. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 13(5), 709-719.
21. Wang, Y., Liu, Y., Yu, H., Zhou, S., Zhang, Z., Wu, D., Zhang, J. (2017). Structural characterization and immuno-enhancing activity of a highly branched water-soluble β -glucan from the spores of *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*, 167, 337-344.
22. Ramberg, J. E., Nelson, E. D., Sinnott, R. A. (2010). Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. *Nutrition Journal*, 9(1), 1-22.
23. Amdekar, S. (2016). *Ganoderma lucidum* (Reishi): source of pharmacologically active compounds. *Current Science*, 111(6), 976-978.
24. Khatian, N., Aslam, M. (2018). A review of *Ganoderma lucidum* (Reishi): A miraculous medicinal mushroom. *Inventi Rapid: Ethnopharmacology*, 4, 1-6.
25. Loyd, A. L., Richter, B. S., Jusino, M. A., Truong, C., Smith, M. E., Blanchette, R. A., Smith, J. A. (2018). Identifying the “mushroom of immortality”: assessing the *Ganoderma* species composition in commercial Reishi products. *Frontiers in Microbiology*, 9:1557, 1-14.
26. Nandi, S., Sikder, R., Acharya, K. (2019). Secondary metabolites of mushrooms: A potential source for anticancer therapeutics with translational opportunities. *In Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology*, Springer, Singapore, p.563.
27. Qi, F., Zhao, L., Zhou, A., Zhang, B., Li, A., Wang, Z., Han, J. (2015). The advantages of using traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy in the whole course of cancer treatment instead of only terminal stage of cancer. *Bioscience Trends*, 9(1), 16-34.
28. Lee, H. H., Lee, S., Lee, K., Shin, Y. S., Kang, H., Cho, H. (2015). Anti-cancer effect of *Cordyceps militaris* in human colorectal carcinoma RKO cells via cell cycle arrest and mitochondrial apoptosis. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1), 1-8.
29. Tomonobu, N., Komalasari, N. L. G. Y., Sumardika, I. W., Jiang, F., Chen, Y., Yamamoto, K. I., Sakaguchi, M. (2020). Xylitol acts as an anticancer monosaccharide to induce selective cancer death via regulation of the glutathione level. *Chemico-Biological Interactions*, 324, 109085, 1-13.
30. Huo, X., Liu, C., Bai, X., Li, W., Li, J., Hu, X., Cao, L. (2017). Aqueous extract of *Cordyceps sinensis* potentiates the antitumor effect of DDP and attenuates therapy-associated toxicity in

- non-small cell lung cancer via I κ B α /NF κ B and AKT/MMP2/MMP9 pathways. *Rsc Advances*, 7(60), 37743-37754.
31. Jin, Y., Meng, X., Qiu, Z., Su, Y., Yu, P., Qu, P. (2018). Anti-tumor and anti-metastatic roles of cordycepin, one bioactive compound of *Cordyceps militaris*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(5), 991-995.
 32. Xu, Z., Chen, X., Zhong, Z., Chen, L., Wang, Y. (2011). *Ganoderma lucidum* polysaccharides: immunomodulation and potential anti-tumor activities. *The American Journal of Chinese Medicine*, 39(1), 15-27.
 33. Wu, K., Na, K., Chen, D., Wang, Y., Pan, H., Wang, X. (2018). Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 on *Ganoderma lucidum* polysaccharides-induced apoptosis of human prostate cancer PC-3 cells. *International Journal of Oncology*, 53(6), 2356-2368.
 34. Sohretoglu, D., Huang, S. (2018). *Ganoderma lucidum* polysaccharides as an anti-cancer agent. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 18(5), 667-674.
 35. Zhao, R. L., He, Y. M. (2018). Network pharmacology analysis of the anti-cancer pharmacological mechanisms of *Ganoderma lucidum* extract with experimental support using Hepa1-6-bearing C57 BL/6 mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 210, 287-295.
 36. Martínez-Montemayor, M. M., Ling, T., Suárez-Arroyo, I. J., Ortiz-Soto, G., Santiago-Negrón, C. L., Lacourt-Ventura, M. Y., Rivas, F. (2019). Identification of biologically active *Ganoderma lucidum* compounds and synthesis of improved derivatives that confer anticancer activities in vitro. *Frontiers in Pharmacology*, 10:115, 1-17.
 37. Lavi, I., Friesem, D., Geresh, S., Hadar, Y., Schwartz, B. (2006). An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. *Cancer Letters*, 244(1), 61-70.
 38. Gu, Y. H., Sivam, G. (2006). Cytotoxic effect of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* on human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells. *Journal of Medicinal Food*, 9(2), 196-204.
 39. Martin, K. R., Brophy, S. K. (2010). Commonly consumed and specialty dietary mushrooms reduce cellular proliferation in MCF-7 human breast cancer cells. *Experimental Biology and Medicine*, 235(11), 1306-1314.
 40. Tong, H., Xia, F., Feng, K., Sun, G., Gao, X., Sun, L., Sun, X. (2009). Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresource Technology*, 100(4), 1682-1686.
 41. Hassan, M. A. A., Rouf, R., Tiralongo, E., May, T. W., Tiralongo, J. (2015). Mushroom lectins: specificity, structure and bioactivity relevant to human disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 7802-7838.
 42. Sałata, A., Lemieszek, M., Parzymies, M. (2018). The nutritional and health properties of an oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr) P. Kumm.). *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 17, 185-197.

43. Refaie, F. M., Esmat, A. Y., Daba, A. S., Osman, W. M., Taha, S. M. (2010). Hepatoprotective activity of polysaccharopeptides from *Pleurotus ostreatus* mycelium on thioacetamide-intoxicated mice. *Micologia Aplicada International*, 22(1), 1-13.
44. Wu, X., Zheng, S., Cui, L., Wang, H., & Ng, T. B. (2010). Isolation and characterization of a novel ribonuclease from the pink oyster mushroom *Pleurotus djamor*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 56(3), 231-239.
45. Jing, X., Mao, D., Geng, L., Xu, C. (2013). Medium optimization, molecular characterization, and bioactivity of exopolysaccharides from *Pleurotus eryngii*. *Archives of Microbiology*, 195(10-11), 749-757.
46. Ma, G., Yang, W., Mariga, A. M., Fang, Y., Ma, N., Pei, F., Hu, Q. (2014). Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Pleurotus eryngii* residue. *Carbohydrate Polymers*, 114, 297-305.
47. Wu, J. Y., Chen, C. H., Chang, W. H., Chung, K. T., Liu, Y. W., Lu, F. J., Chen, C. H. (2011). Anti-cancer effects of protein extracts from *Calvatia lilacina*, *Pleurotus ostreatus* and *Volvariella volvacea*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1-10.
48. Wiater, A., Paduch, R., Pleszczyńska, M., Próchniak, K., Choma, A., Kandefer-Szerszeń, M., Szczodrak, J. (2011). α -(1 \rightarrow 3)-d-Glucans from fruiting bodies of selected macromycetes fungi and the biological activity of their carboxymethylated products. *Biotechnology Letters*, 33(4), 787-795.
49. Wiater, A., Paduch, R., Choma, A., Sylwia, S., Pleszczyńska, M., Tomczyk, M., Janusz, S. (2015). (1 \rightarrow 3)- α -D-Glucans from *Aspergillus* spp.: structural characterization and biological study on their carboxymethylated derivatives. *Current Drug Targets*, 16(13), 1488-1494.
50. Sharif, S., Atta, A., Huma, T., Shah, A. A., Afzal, G., Rashid, S., Mustafa, G. (2018). Anticancer, antithrombotic, antityrosinase, and anti- α -glucosidase activities of selected wild and commercial mushrooms from Pakistan. *Food Science and Nutrition*, 6(8), 2170-2176.
51. Facchini, J. M., Alves, E. P., Aguilera, C., Gern, R. M. M., Silveira, M. L. L., Wisbeck, E., Furlan, S. A. (2014). Antitumor activity of *Pleurotus ostreatus* polysaccharide fractions on Ehrlich tumor and Sarcoma 180. *International Journal of Biological Macromolecules*, 68, 72-77.
52. Zhang, Y., Li, Q., Shu, Y., Wang, H., Zheng, Z., Wang, J., Wang, K. (2015). Induction of apoptosis in S180 tumour bearing mice by polysaccharide from *Lentinus edodes* via mitochondria apoptotic pathway. *Journal of Functional Foods*, 15, 151-159.
53. Finimundy, T. C., Scola, G., Scariot, F. J., Dillon, A. J., Moura, S., Echeverrigaray, S., Roesch-Ely, M. (2018). Extrinsic and intrinsic apoptotic responses induced by shiitake culinary-medicinal mushroom *Lentinus edodes* (*Agaricomycetes*) aqueous extract against a larynx carcinoma cell line. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 20(1), 31-46.
54. Zhang, Y., Ma, G., Fang, L., Wang, L., Xie, J. (2014). The immunostimulatory and anti-tumor activities of polysaccharide from *Agaricus bisporus* (brown). *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(3), 122-126.
55. Smiderle, F. R., Ruthes, A. C., van Arkel, J., Chanput, W., Iacomini, M., Wichers, H. J., Van Griensven, L. J. (2011). Polysaccharides from *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis*

- show similarities in their structures and their immunomodulatory effects on human monocytic THP-1 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11(1), 1-11.
56. Pires, A. D. R. A., Ruthes, A. C., Cadena, S. M. S. C., Iacomini, M. (2017). Cytotoxic effect of a mannogalactoglucan extracted from *Agaricus bisporus* on HepG2 cells. *Carbohydrate polymers*, 170, 33-42.
57. Poyraz, B., Güneş, H., Bahar, T. Ü. L., Sermenli, H. B. (2015). Antibacterial and antitumor activity of crude methanolic extracts from various macrofungi species. *Research Journal of Biology Sciences*, 8(1), 5-10.
58. Song, F. Q., Liu, Y., Kong, X. S., Chang, W., Song, G. (2013). Progress on understanding the anticancer mechanisms of medicinal mushroom: *Inonotus obliquus*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(3), 1571-1578.
59. Çöl B., Balcı E., Güneş H., Allı H. (2017). Schizophyllum commune Fr. türünden misel eldesi, moleküler tanımlanması ve antitümör etkisinin araştırılması: *Süleyman Demirel University Journal of Natural and Applied Sciences*, 21(2) 586-591.
60. Kosanić, M., Ranković, B., Rančić, A., Stanojković, T. (2016). Evaluation of metal concentration and antioxidant, antimicrobial, and anticancer potentials of two edible mushrooms *Lactarius deliciosus* and *Macrolepiota procera*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(3), 477-484.
61. Xu, T., B Beelman, R., D Lambert, J. (2012). The cancer preventive effects of edible mushrooms. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 12(10), 1255-1263.
62. Mei, Y., Zhu, H., Hu, Q., Liu, Y., Zhao, S., Peng, N., Liang, Y. (2015). A novel polysaccharide from mycelia of cultured *Phellinus linteus* displays antitumor activity through apoptosis. *Carbohydrate Polymers*, 124, 90-97.
63. Lu, T. L., Huang, G. J., Lu, T. J., Wu, J. B., Wu, C. H., Yang, T. C., Chen, Y. F. (2009). Hispolon from *Phellinus linteus* has antiproliferative effects via MDM2-recruited ERK1/2 activity in breast and bladder cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8), 2013-2021.
64. Huang, H. Y., Chieh, S. Y., Tso, T. K., Chien, T. Y., Lin, H. T., Tsai, Y. C. (2011). Orally administered mycelial culture of *Phellinus linteus* exhibits antitumor effects in hepatoma cell-bearing mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 460-466.
65. Pei, J. J., Wang, Z. B., Ma, H. L., Yan, J. K. (2015). Structural features and antitumor activity of a novel polysaccharide from alkaline extract of *Phellinus linteus* mycelia. *Carbohydrate Polymers*, 115, 472-477.
66. Delmanto, R. D., de Lima, P. L. A., Sugui, M. M., da Eira, A. F., Salvadori, D. M. F., Speit, G., Ribeiro, L. R. (2001). Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 496(1-2), 15-21.
67. Niu, Y. C., Liu, J. C., Zhao, X. M., Wu, X. X. (2008). A low molecular weight polysaccharide isolated from *Agaricus blazei* suppresses tumor growth and angiogenesis in vivo. *Oncology Reports*, 21(1), 145-152.

68. Matsushita, Y., Furutani, Y., Matsuoka, R., Furukawa, T. (2018). Hot water extract of *Agaricus blazei* Murrill specifically inhibits growth and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 1-11.
69. Masuda, Y., Inoue, M., Miyata, A., Mizuno, S., Nanba, H. (2009). Maitake β -glucan enhances therapeutic effect and reduces myelosuppression and nephrotoxicity of cisplatin in mice. *International Immunopharmacology*, 9(5), 620-626.
70. Alonso, E. N., Orozco, M., Nieto, A. E., Balogh, G. A. (2013). Genes related to suppression of malignant phenotype induced by Maitake D-Fraction in breast cancer cells. *Journal of Medicinal Food*, 16(7), 602-617.
71. He, Y., Li, X., Hao, C., Zeng, P., Zhang, M., Liu, Y., Zhang, L. (2018). *Grifola frondosa* polysaccharide: a review of antitumor and other biological activity studies in China. *Discovery Medicine*, 25(138), 159-176.
72. Roca-Lema, D., Martínez-Iglesias, O., de Ana Portela, C. F., Rodríguez-Blanco, A., Valladares-Ayerbes, M., Díaz-Díaz, A., Figueroa, A. (2019). In vitro anti-proliferative and anti-invasive effect of polysaccharide-rich extracts from *Trametes versicolor* and *Grifola frondosa* in colon cancer cells. *International Journal of Medical Sciences*, 16(2), 231.
73. Chang, H. H., Hsieh, K. Y., Yeh, C. H., Tu, Y. P., Sheu, F. (2010). Oral administration of an Enoki mushroom protein FVE activates innate and adaptive immunity and induces anti-tumor activity against murine hepatocellular carcinoma. *International Immunopharmacology*, 10(2), 239-246.
74. Krasnopolskaya, L. M., Shuktueva, M. I., Avtonomova, A. V., Yarina, M. S., Dzhavakhyan, B. R., Isakova, E. B., Bukhman, V. M. (2016). Antitumor and antioxidant properties of water-soluble polysaccharides from submerged mycelium of *Flammulina velutipes*. *Antibiotiki i khimioterapiia= Antibiotics and Chemotherapy*, 61(11-12), 16-20.
75. Latha, K., Baskar, R. (2014). Comparative study on the production, purification and characterization of exopolysaccharides from oyster mushrooms, *Pleurotus florida* and *Hypsizygus ulmarius* and their applications. In Proceedings of 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8), I&II, 192-198.
76. Phaniendra, A., Jestadi, D. B., Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11-26.
77. Nimse, S. B., Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *The Royal Society of Chemistry Advances*, 5(35), 27986-28006.
78. Hochmann, M. (1988). Les annotations marginales de Federico Zuccaro à un exemplaire des «Vies» de Vasari. La réaction anti-vasarienne à la fin du XVIe siècle. *Revue de l'Art*, 80(1), 64-71.
79. Botterweck, A. A. M., Verhagen, H., Goldbohm, R. A., Kleinjans, J., Van den Brandt, P. A. (2000). Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. *Food and Chemical Toxicology*, 38(7), 599-605.

80. Babu, D. R., Rao, G. N. (2013). Antioxidant properties and electrochemical behavior of cultivated commercial Indian edible mushrooms. *Journal of Food Science and Technology*, 50(2), 301-308.
81. Atila, F., Tuzel, Y., Fernández, J. A., Cano, A. F., Sen, F. (2018). The effect of some agro-industrial wastes on yield, nutritional characteristics and antioxidant activities of *Hericium erinaceus* isolates. *Scientia Horticulturae*, 238, 246-254.
82. Gąsecka, M., Siwulski, M., Magdziak, Z., Budzyńska, S., Stuper-Szablewska, K., Niedzielski, P., Mleczek, M. (2020). The effect of drying temperature on bioactive compounds and antioxidant activity of *Leccinum scabrum* (Bull.) Gray and *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. *Journal of Food Science and Technology*, 57(2), 513-525.
83. Côté, J., Caillet, S., Doyon, G., Sylvain, J. F., Lacroix, M. (2010). Analyzing cranberry bioactive compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(9), 872-888.
84. Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'arrigo, M., Rostagno, M. A., Martínez, J. A., Villares, A. (2011). Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 128(3), 674-678.
85. Wong, K. H., Sabaratnam, V., Abdullah, N., Kuppasamy, U. R., Naidu, M. (2009). Effects of cultivation techniques and processing on antimicrobial and antioxidant activities of *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 47(1), 47-55.
86. Atila, F. (2019). Comparative evaluation of the antioxidant potential of *Hericium erinaceus*, *Hericium americanum* and *Hericium coralloides*. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*, 18(6), 97-106.
87. Woldegiorgis, A. Z., Abate, D., Haki, G. D., Ziegler, G. R. (2014). Antioxidant property of edible mushrooms collected from Ethiopia. *Food Chemistry*, 157, 30-36.
88. Rajasekaran, M., Kalaimagal, C. (2011). In vitro antioxidant activity of ethanolic extract of a medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum*. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(9), 1427.
89. Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljevic, D., Helsper, J. P., Van Griensven, L. J. (2011). Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food chemistry*, 129(4), 1667-1675.
90. Abdullah, N., Ismail, S. M., Aminudin, N., Shuib, A. S., Lau, B. F. (2012). Evaluation of selected culinary-medicinal mushrooms for antioxidant and ACE inhibitory activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1-12.
91. Fazoranti, O., Ogidi, C. O., Oyetayo, V. O. (2019). Nutrient contents and antioxidant properties of *Pleurotus* spp. cultivated on substrate fortified with Selenium. *Current Research Environmental and Applied Mycology*, 9, 66-76.
92. Jayakumar, T., Ramesh, E., Geraldine, P. (2006). Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl₄-induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 44(12), 1989-1996.

93. Jayakumar, T., Sakthivel, M., Thomas, P. A., Geraldine, P. (2008). *Pleurotus ostreatus*, an oyster mushroom, decreases the oxidative stress induced by carbon tetrachloride in rat kidneys, heart and brain. *Chemico-Biological Interactions*, 176(2-3), 108-120.
94. Nada, S. A., Omara, E. A., Abdel-Salam, O. M., Zahran, H. G. (2010). Mushroom insoluble polysaccharides prevent carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rat. *Food and Chemical Toxicology*, 48(11), 3184-3188.
95. Liu, J., Jia, L., Kan, J., Jin, C. H. (2013). In vitro and in vivo antioxidant activity of ethanolic extract of white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food and Chemical Toxicology*, 51, 310-316.
96. Xu, W. W., Li, B., Lai, E. T. C., Chen, L., Huang, J. J. H., Cheung, A. L. M., Cheung, P. C. K. (2014). Water extract from *Pleurotus pulmonarius* with antioxidant activity exerts in vivo chemoprophylaxis and chemosensitization for liver cancer. *Nutrition and Cancer*, 66(6), 989-998.
97. Meng, F., Zhou, B., Lin, R., Jia, L., Liu, X., Deng, P., Zhang, J. (2010). Extraction optimization and in vivo antioxidant activities of exopolysaccharide by *Morchella esculenta* SO-01. *Bioresource Technology*, 101(12), 4564-4569.
98. Jayakumar, T., Thomas, P. A., Sheu, J. R., & Geraldine, P. (2011). In-vitro and in-vivo antioxidant effects of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Food Research International*, 44(4), 851-861.
99. You, R., Wang, K., Liu, J., Liu, M., Luo, L., Zhang, Y. (2011). A comparison study between different molecular weight polysaccharides derived from *Lentinus edodes* and their antioxidant activities in vivo. *Pharmaceutical Biology*, 49(12), 1298-1305.
100. Yan, J. K., Wang, Y. Y., Ma, H. L., Wang, Z. B., Pei, J. J. (2016). Structural characteristics and antioxidant activity in vivo of a polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* mycelia. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 65, 110-117.
101. Barros, L., Calhella, R. C., Vaz, J. A., Ferreira, I. C., Baptista, P., Estevinho, L. M. (2007). Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *European Food Research and Technology*, 225(2), 151-156.
102. Skalicka-Wozniak, K., Szykowski, J., Los, R., Siwulski, M., Sobieralski, K., Glowinski, K., Malm, A. (2012). Evaluation of polysaccharides content in fruit bodies and their antimicrobial activity of four *Ganoderma lucidum* (W Curt.: Fr.) P. Karst. strains cultivated on different wood type substrates. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 81(1).
103. Tamilselvan, N., Rajesh, K. (2019). Antimicrobial efficacy of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*, *International Journal of Trend in Scientific Research and Development*, 5(1), 1798-1800.
104. Ramesh, C. H., Pattar, M. G. (2010). Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India. *Pharmacognosy Research*, 2(2), 107-112.
105. Getha, K., Hatsu, M., Wong, H. J., Lee, S. S. (2009). Submerged cultivation of basidiomycete fungi associated with root diseases for production of valuable bioactive metabolites. *Journal of Tropical Forest Science*, (21)1, 1-7.

106. Suseem, S. R., Saral, A. M. (2013). Analysis on essential fatty acid esters of mushroom *Pleurotus eous* and its antibacterial activity. *Asian Journal of Pharmaceutical Clinical Research*, 6(1), 188-91.
107. Kosanić, M., Ranković, B., Dašić, M. (2012). Mushrooms as possible antioxidant and antimicrobial agents. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11(4), 1095-1102.
108. Moglad, E. H., Saadabi, A. M. (2012). Screening of antimicrobial activity of wild mushrooms from Khartoum State of Sudan. *Microbiology Journal*, 2(2), 64-69.
109. Hussein, A. R., Ali, E. M., Hamid, E. (2018). Antibacterial activity of alcoholic and aqueous extracts of *Agaricus bisporus* against food borne bacterial pathogens. *Al-Nahrain Journal of Science*, 21(1), 111-114.
110. Waqas, H. M., Akbar, M., Khalil, T., Ishfaq, M., Aslam, N., Chohan, S. A., Iqbal, M. S. (2018). Identification of natural antifungal constituents from *Agaricus Bisporus* (Je Lange) Imbach. *Applied Ecology and Environmental Research*, 16(6), 7937-7951.
111. Casaril, K. B. P. B., Kasuya, M. C. M., Vanetti, M. C. D. (2011). Antimicrobial activity and mineral composition of shiitake mushrooms cultivated on agricultural waste. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(5), 991-1002.
112. Heleno, S. A., Barros, L., Martins, A., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Glamoclija, J., Ferreira, I. C. (2015). Nutritional value, bioactive compounds, antimicrobial activity and bioaccessibility studies with wild edible mushrooms. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 799-806.
113. Chowdhury, M. M. H., Kubra, K., Ahmed, S. R. (2015). Screening of antimicrobial, antioxidant properties and bioactive compounds of some edible mushrooms cultivated in Bangladesh. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14(1), 8.
114. Stanley, H. O., Onwuna, D. B., Ugboma, C. J. (2018). The antimicrobial activity of sclerotia of *Pleurotus tuberregium* (Osu) on some clinical isolates. *Journal of Advances in Microbiology*, (8)4:1-4.
115. Al-Faqeeh, L. A. S., Naser, R., SR., K., Khan, S. W. (2019). TLC and FTIR analyses of *Hypsizygus ulmarius* (Bull.) fruiting bodies. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research*, 17, 61-71.
116. Dong, Y., Zhang, J., Gao, Z., Zhao, H., Sun, G., Wang, X., Jia, L. (2019). Characterization and anti-hyperlipidemia effects of enzymatic residue polysaccharides from *Pleurotus ostreatus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 316-325.
117. Nwobi, N. L., Usiobeigbe, O. S., Osaro, R. O., Nwobi, J. C. (2019). Ameliorative effect of *Pleurotus ostreatus* on lipid levels and atherogenic indices in hyperlipidemic rats. *Asian Journal of Research in Medical and Pharmaceutical Sciences*, (8)3-4, 1-6.
118. Piskov, S., Timchenko, L., Grimm, W. D., Rzhepakovsky, I., Avanesyan, S., Sizonenko, M., Kurchenko, V. (2020). Effects of various drying methods on some physico-chemical properties and the antioxidant profile and ACE inhibition activity of oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*). *Foods*, 9(2):160, 1-26.

119. Anandhi, R., Annadurai, T., Anitha, T. S., Muralidharan, A. R., Najmunnisha, K., Nachiappan, V., Geraldine, P. (2013). Antihypercholesterolemic and antioxidative effects of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, and its major constituent, chrysin, in Triton WR-1339-induced hypercholesterolemic rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 69(2), 313-323.
120. Jeong, S. C., Jeong, Y. T., Yang, B. K., Islam, R., Koyyalamudi, S. R., Pang, G., Song, C. H. (2010). White button mushroom (*Agaricus bisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterolemic rats. *Nutrition Research*, 30(1), 49-56.
121. Priya, G., Chellaram, C. (2011). In vivo Anti-hyperlipidemic effects of edible mushroom, *Agaricus bisporus*. *Advanced Biotechnology*, 10(7), 38-40.
122. Balakrishnan, P., Loganayagi, C. T. (2018). Antihyperglycemic activity of *Agaricus bisporus* mushroom extracts on alloxan induced diabetic rats. *International Journal of Pharma Research Health Science*, 6(2), 2475-79.
123. Kała, K., Kryczyk-Poprawa, A., Rzewińska, A., Muszyńska, B. (2020). Fruiting bodies of selected edible mushrooms as a potential source of lovastatin. *European Food Research and Technology*, 246(4), 713-722.
124. Chen, J., Mao, D., Yong, Y., Li, J., Wei, H., Lu, L. (2012). Hepatoprotective and hypolipidemic effects of water-soluble polysaccharidic extract of *Pleurotus eryngii*. *Food Chemistry*, 130(3), 687-694.
125. Chen, L., Zhang, Y., Sha, O., Xu, W., Wang, S. (2016). Hypolipidaemic and hypoglycaemic activities of polysaccharide from *Pleurotus eryngii* in Kunming mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1206-1209.
126. Xu, N., Ren, Z., Zhang, J., Song, X., Gao, Z., Jing, H., Jia, L. (2017). Antioxidant and anti-hyperlipidemic effects of mycelia zinc polysaccharides by *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 204-214.
127. Zhang, C., Li, J., Wang, J., Song, X., Zhang, J., Wu, S., Jia, L. (2017). Antihyperlipidaemic and hepatoprotective activities of acidic and enzymatic hydrolysis exopolysaccharides from *Pleurotus eryngii* SI-04. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1-11.
128. Zhang, C., Zhang, L., Liu, H., Zhang, J., Hu, C., Jia, L. (2018). Antioxidation, anti-hyperglycaemia and renoprotective effects of extracellular polysaccharides from *Pleurotus eryngii* SI-04. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 219-228.
129. Sarker, M.M.R. (2015). Antihyperglycemic, insulin-sensitivity and anti-hyperlipidemic potential of *Ganoderma lucidum*, a dietary mushroom, on alloxan-and glucocorticoid-induced diabetic Long-Evans rats. *Functional Foods in Health and Disease*, 5(12), 450-466.
130. Meneses, M. E., Martínez-Carrera, D., Torres, N., Sánchez-Tapia, M., Aguilar-López, M., Morales, P., Tovar, A.R.(2016). Hypocholesterolemic properties and prebiotic effects of Mexican *Ganoderma lucidum* in C57BL/6 mice. *PloS one*, 11(7): e0159631.
131. Xu, Y., Zhang, X., Yan, X. H., Zhang, J. L., Wang, L. Y., Xue, H., Liu, X. J. (2019). Characterization, hypolipidemic and antioxidant activities of degraded polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 706-716.

132. Li, L., Xu, J. X., Cao, Y. J., Lin, Y. C., Guo, W. L., Liu, J. Y., Rao, P. F. (2019). Preparation of *Ganoderma lucidum* polysaccharide-chromium (III) complex and its hypoglycemic and hypolipidemic activities in high-fat and high-fructose diet-induced pre-diabetic mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140, 782-793.
133. Wang, L., Xu, N., Zhang, J., Zhao, H., Lin, L., Jia, S., Jia, L. (2015). Antihyperlipidemic and hepatoprotective activities of residue polysaccharide from *Cordyceps militaris* SU-12. *Carbohydrate Polymers*, 131, 355-362.
134. Liu, R. M., Dai, R., Luo, Y., Xiao, J. H. (2019). Glucose-lowering and hypolipidemic activities of polysaccharides from *Cordyceps taii* in streptozotocin-induced diabetic mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 230.
135. Yoon, K. N., Alam, N., Lee, J. S., Cho, H. J., Kim, H. Y., Shim, M. J., Lee, T. S. (2011). Antihyperlipidemic effect of dietary *Lentinus edodes* on plasma, feces and hepatic tissues in hypercholesterolemic rats. *Mycobiology*, 39(2), 96-102.
136. Yang, H., Hwang, I., Kim, S., Hong, E. J., Jeung, E. B. (2013). *Lentinus edodes* promotes fat removal in hypercholesterolemic mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 6(6), 1409-1413.
137. Zhang, Y., Hu, T., Zhou, H., Zhang, Y., Jin, G., Yang, Y. (2016). Antidiabetic effect of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 83, 126-132.
138. Pandimeena, M., Prabu, M., Sumathy, R., Kumuthakalavalli, R. (2015). Evaluation of phytochemicals and in vitro anti-inflammatory, anti-diabetic activity of the white oyster mushroom, *Pleurotus florida*. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Science*, 5, 16-21.
139. Khatun, S., Islam, A., Guler, P., Cakilcioglu, U., Chatterjee, N. C. (2013). Hypoglycemic activity of a dietary mushroom *Pleurotus florida* on alloxan induced diabetic rats. *Biological Diversity Conservation*, 6, 91-96.
140. Balaji, P., Madhanraj, R., Rameshkumar, K., Veeramanikandan, V., Eyini, M., Arun, A., Mahmoud, A. H. (2020). Evaluation of antidiabetic activity of *Pleurotus pulmonarius* against streptozotocin-nicotinamide induced diabetic wistar albino rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(3), 913-924.
141. Ng, S. H., Zain, M., Shazwan, M., Zakaria, F., Ishak, W., Rosli, W., Nizam, W. A. (2015). Hypoglycemic and antidiabetic effect of *Pleurotus sajor-caju* aqueous extract in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *BioMed Research International*, 2015, Article ID 214918
142. Etewa, R. L., Mohamed, H. (2010). Hypoglycemic effect of button (*Agaricus bisporus*) and oyster (*pleurotus ostreatus*) mushrooms on streptozotocin induced diabetic mice. *Biohealth Science Bulletin*, 2(2), 48-51.
143. Kumar, P. M. R., Kumar, M. S., Manivel, A., Mohan, S. C. (2018). Structural Characterization and Anti-Diabetic Activity of Polysaccharides from *Agaricus bisporus* Mushroom. *Phytochemistry*, 12(1), 14-20.
144. Zaid, O. A. A., Sonbaty, S. E., Neama, M. A. Anti-diabetic activity of *Agaricus bisporus*: A biochemical and pathological study. *International Journal of Pharma Science*, 7(2), 1740-1745.


145. Balakrishnan, P., Loganayagi, C. T. (2018). Antihyperglycemic activity of *Agaricus bisporus* mushroom extracts on alloxan induced diabetic rats. *International Journal of Pharma Research and Health Science*, 6(2), 2475-2479.
146. Kim, H. M., Kang, J. S., Kim, J. Y., Park, S. K., Kim, H. S., Lee, Y. J., Han, S. B. (2010). Evaluation of antidiabetic activity of polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* in non-obese diabetic mouse. *International Immunopharmacology*, 10(1), 72-78.
147. Zhang, L., Liu, Y., Ke, Y., Liu, Y., Luo, X., Li, C., Hu, B. (2018). Antidiabetic activity of polysaccharides from *Suillellus luridus* in streptozotocin-induced diabetic mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 134-140.
148. Stojkovic, D., Smiljkovic, M., Ciric, A., Glamoclija, J., Van Griensven, L., Ferreira, I. C., Sokovic, M. (2019). An insight into antidiabetic properties of six medicinal and edible mushrooms: Inhibition of α -amylase and α -glucosidase linked to type-2 diabetes. *South African Journal of Botany*, 120, 100-103.
149. Vincent, M., Philippe, E., Everard, A., Kassis, N., Rouch, C., Denom, J., Migrenne, S. (2013). Dietary supplementation with *Agaricus blazei* Murill extract prevents diet-induced obesity and insulin resistance in rats. *Obesity*, 21(3), 553-561.
150. Chen, L., Zhang, Y., Sha, O., Xu, W., Wang, S. (2016). Hypolipidaemic and hypoglycaemic activities of polysaccharide from *Pleurotus eryngii* in Kunming mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1206-1209.
151. Oluba, O. M., Onyeneke, E. C., Ojeh, G. C., Idonije, B.O. (2010). Evaluation of the hypoglycemic effect of aqueous extract of *Ganoderma lucidum* on STZ-induced diabetic wistar rats. *Annals of Biological Research*, 1(3), 41-49.
152. Ma, H. T., Hsieh, J. F., Chen, S. T. (2015). Anti-diabetic effects of *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 114, 109-113.
153. Xiao, C., Wu, Q., Zhang, J., Xie, Y., Cai, W., Tan, J. (2017). Antidiabetic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides F31 down-regulated hepatic glucose regulatory enzymes in diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 196, 47-57.
154. Guo, W. L., Shi, F. F., Li, L., Xu, J. X., Chen, M., Wu, L., Zhang, Y. Y. (2019). Preparation of a novel *Grifola frondosa* polysaccharide-chromium (III) complex and its hypoglycemic and hypolipidemic activities in high fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 81-88.
155. Kou, L., Du, M., Liu, P., Zhang, B., Zhang, Y., Yang, P., Wang, X. (2019). Anti-diabetic and anti-nephritic activities of *Grifola frondosa* mycelium polysaccharides in diet-streptozotocin-induced diabetic rats via modulation on oxidative stress. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(1), 310-322.
156. Chen, Y., Liu, Y., Sarker, M. M. R., Yan, X., Yang, C., Zhao, L., Zhao, C. (2018). Structural characterization and antidiabetic potential of a novel heteropolysaccharide from *Grifola frondosa* via IRS1/PI3K-JNK signaling pathways. *Carbohydrate Polymers*, 198, 452-461.

157. Meera, K. S., Sudha, G., Rajathi, K., Manjusha, G. V. (2011). Antidiabetic effect of aqueous extract of *Hypsizygus ulmarius* on Streptozotocin-Nicotinamide induced diabetic rats. *Asian Journal of Pharmaceutical and Biological Research*, 1(2),151-157.



PULMONER ARTERİYEL HİPERTANSİYON TEDAVİSİNDE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR

CURRENT APPROACHES IN PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION TREATMENT

Cenk YILDIZ¹ , Burcu DEVRİM^{2,*} 

¹Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 58140,
Sivas, Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 06560, Ankara,
Türkiye

ÖZ

Amaç: Pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH), yüksek morbidite ve mortaliteye sahip kronik bir hastalıktır. PAH için uygulanan tedavi stratejileri hastaların yaşam kalitesinin iyileşmesini sağlamakla birlikte, hastaların büyük çoğunluğu için PAH, tedavi olasılığı olmayan hayatı sınırlayan bir hastalık olmaya devam etmektedir. Mevcut PAH tedavisinde karşılaşılan en önemli sorunlar hasta uyuncunun düşük olması ve yan etkilerin görülmesidir. Bu derlemede, PAH tedavisinde rhoA/rho kinaz, tirozin kinaz, endotel progenitör hücreleri, vazoaaktif bağırsak peptiti ve miRNA gibi çeşitli yeni moleküler yolakların potansiyeli tartışılmıştır. Ayrıca, tedavide kullanılmak üzere onaylanmış ve inceleme aşamasında olan etkin maddelerin etkinliğini artırmak için hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımına yönelik çeşitli yöntemler değerlendirilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: PAH, pulmoner vasküler direncin artması ve sonunda sağ kalp yetmezliği ve ölümlerle sonuçlanan ilerleyici pulmoner vasküler fonksiyonel ve yapısal değişikliklerle karakterize kronik bir hastalıktır. PAH patofizyolojisinden sorumlu hücresel ve moleküler mekanizmalar hakkındaki bilgilerin artması PAH tedavisinde yeni terapötik yaklaşımların oluşmasını sağlamıştır. Bu yaklaşımlar arasında rhoA/rho kinaz, tirozin kinaz, endotel progenitör hücreleri, vazoaaktif bağırsak peptiti ve miRNA gibi çeşitli yeni moleküler yolakların kullanımı yer almaktadır. Ayrıca, PAH tedavisinde ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımı etkin maddelerin lokal olarak etki bölgesine hedeflendirilmesini sağlayarak optimum etkinin elde edilmesi ve yan etki görülme potansiyelinin azaltılması açısından umut verici olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Hedeflendirilmiş tedavi, ilaç taşıyıcı sistemler, pulmoner arteriyel hipertansiyon, tedavi stratejileri

ABSTRACT

Objective: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a chronic disease with high morbidity and mortality.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Burcu Devrim
e-posta / e-mail: bdevrim@pharmacy.ankara.edu.tr, Tel. / Phone: +903122033162

Although the applied treatment strategies provide an improvement in the quality of life of the patients, PAH continues to be a life-limiting disease for most patients, without the possibility of treatment. The most important problems encountered in the current therapies for PAH are patient incompliance and off-target side effects. In this review, the potential of various new molecular pathways such as rhoA/rho kinase, tyrosine kinase, endothelial progenitor cells, vasoactive intestinal peptide and miRNA are discussed in the treatment of PAH. In addition, various methods for the use of targeted drug delivery systems have been evaluated to improve the efficacy of approved and investigational drugs.

Result and Discussion: PAH is a chronic disease characterized by increased pulmonary vascular resistance and progressive pulmonary vascular functional and structural changes that eventually result in right heart failure and death. Increasing knowledge about the cellular and molecular mechanisms responsible for PAH pathophysiology has led to the emergence of new therapeutic approaches for PAH treatment. These approaches include the use of various new molecular pathways such as rhoA/rho kinase, tyrosine kinase, endothelial progenitor cells, vasoactive intestinal peptide, and miRNA. Furthermore, the use of drug delivery systems in the treatment of PAH has been promising in terms of achieving the optimum effect and reducing the potential for side effects by ensuring that the active substances are targeted locally to the effect area.

Keywords: Drug delivery systems, pulmonary arterial hypertension, targeted therapy, treatment strategies

GİRİŞ

Pulmoner hipertansiyon (PH), pulmoner basıncın progresif yükselmesi ile ilişkili hayatı tehdit eden kardiyopulmoner bir hastalıktır. PH'a neden olan çok sayıda etiyoloji hastalığın tedavisini ve prognozunu etkilemektedir. Uluslararası standartlar için Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), 1973 yılında hastalığın nedenine bağlı olarak PH tanısı için bir sınıflandırma yapmıştır [1]. PH için ilk tanı ve tedavi kılavuzu 1998 yılında yayınlanmıştır. En son güncellenen sınıflama ve kılavuz ise 2015 yılında yayınlanmıştır. Bu kılavuz Türk Kardiyoloji Derneği tarafından dilimize çevrilmiştir.

Birden fazla klinik durumu içerebilecek PH, dinlenme konumunda sağ kalp kateterizasyonu ile değerlendirilen ortalama pulmoner arter basıncında ≥ 25 mmHg'lik artış şeklinde tanımlanan kalp ve damar hastalıklarının ve solunum hastalıklarının çoğunu daha da karmaşık hale getirebilecek hemodinamik ve fizyopatolojik bir durumdur [2].

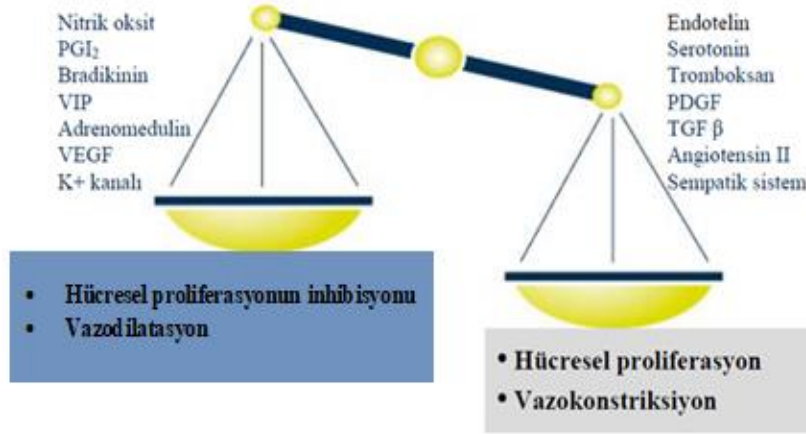
Pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH), PH'nun hızlı ilerleyen ve yaşamı tehdit edici bir alt grubudur [3]. PAH; endotel disfonksiyonu, intima ve düz kas hücre çoğalması ile karakterizedir. Pulmoner vasküler direncin ve basıncın progresif olarak artması sağ ventrikül performansını düşürmekte, sonrasında sağ kalp yetmezliği ve ölüm ile sonuçlanmaktadır.

Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon

Pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH), küçük pulmoner arterlerde pulmoner vasküler yeniden şekillenme, artmış pulmoner arteriyel basınç ve pulmoner vasküler direnç ile karakterize bir hastalıktır [4]. Sağlıklı bireylerde sağ ventrikül kirli kanı oksijenlenmesi için pulmoner arterler aracılığıyla akciğerlere pompalamakta, ancak hastalık geliştiğinde bu damarlarda daralma gerçekleşmektedir. Bunun sonucunda damarlara kan pompalayan sağ ventrikül zorlanmakta ve genişlemektedir. PAH'da

pulmoner vasküler direncin ilerleyici artışı, pulmoner vasküler kompliyansın azalması ve artan pulmoner arter basıncı sağ kalp disfonksiyonu ve ölüm ile sonuçlanmaktadır [5].

Hastalık fizyopatolojik olarak vazodilatör etkili (prostasiklin, nitrik oksit, vazoaaktif intestinal peptit) ve vazokonstriktör etkili (tromboksan A₂, endotelin, serotonin) faktörlerin, büyüme inhibitörlerinin ve mitojenik faktörlerin, antitrombotik ve trombotik faktörlerin arasındaki denge bozukluğundan kaynaklanmaktadır (Şekil 1). Sonuç olarak prostasiklin ve nitrik oksit gibi vazodilatör ajanların üretimi azalırken, endotelin gibi vazokonstriktör ajanların üretimi artmaktadır [6].



Şekil 1. PAH fizyopatolojisinde etkili faktörler

PAH'ın Risk Faktörleri ve Semptomları

PAH etiyojisinde ilaçlar, toksinler ve enfeksiyonlar rol oynamaktadır. PAH için risk faktörleri Tablo 1'de verilmiştir [2,7].

Tablo 1. PAH risk faktörleri

İlaç ve toksinler	Demografik ve tıbbi durum	Hastalıklar
1. Kesin <ul style="list-style-type: none"> Aminorex Fenfluramin Dexfenfluramin Toksik kolza yağı Benfluoreks Seçici serotonin gerilim inhibitörleri 	1. Kesin <ul style="list-style-type: none"> Cinsiyet 	1. Kesin <ul style="list-style-type: none"> HIV enfeksiyonu
2. Çok olası <ul style="list-style-type: none"> Amfetaminler L-triptopan Dasatinib Metamfetaminler 	2. Olası <ul style="list-style-type: none"> Gebelik Sistemik hipertansiyon 	2. Çok olası <ul style="list-style-type: none"> Portal hipertansiyon/Karaciğer hastalığı Kollagen vasküler hastalık Kongenital, sistemik-pulmoner-kardiyak şantlar
3. Olası <ul style="list-style-type: none"> Kokain Kemoterapötik ajanlar Sarı kantaron Fenilpropanolamin Amfetamin benzeri ilaçlar İnterferon α ve β 		3. Olası <ul style="list-style-type: none"> Tiroid hastalıkları

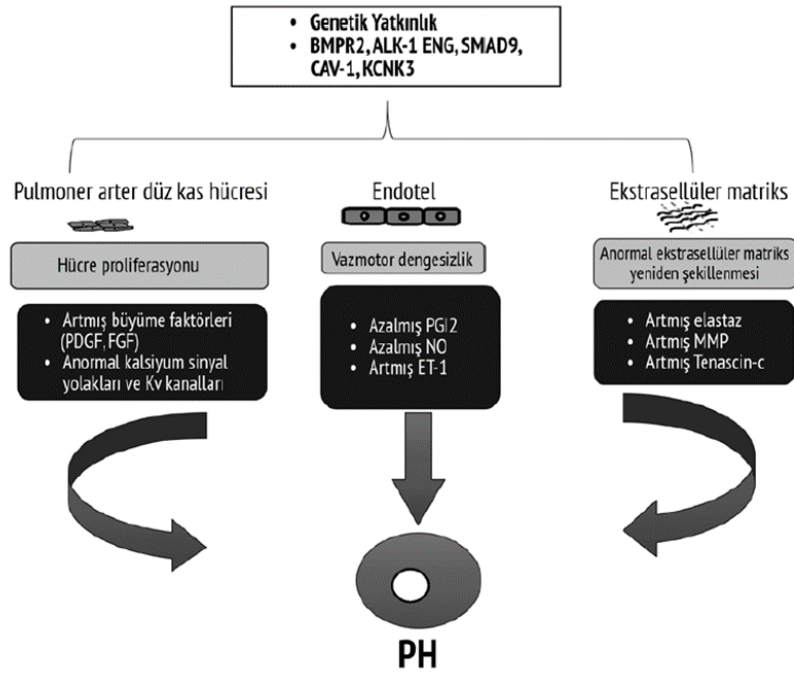
PAH'lı hastalarda oksijen taşınmasındaki kötüleşme ve kalp debisindeki azalmaya bağlı semptomlar görülmektedir [8]. PAH'da erken evrede semptomlar olmadığı gibi, nonspesifik olabilir veya hastalar asemptomatiktir. Bazı durumlarda ise tanı konmadan 2 yıl önce hastalık belirtilerinin başlayabildiği gözlenmiştir [7]. Bu belirtiler dispne, yorgunluk, güçsüzlük, genel egzersiz intoleransı, göğüs ağrısı, senkop ve abdominal distansiyon olarak sayılabilir. Egzersiz dispnesi hastalığın erken döneminde diğer semptomlara göre daha sık görülmektedir [8].

PAH'ın Prevelansı

Ortalama pulmoner arter basıncı ve pulmoner vasküler dirençte artma ile karakterize olan PAH, çoğunlukla genç kadınlarda görülen, geç tanı konan, yavaş ilerleyen ve erken yaşta ölümlü sonuçlanan bir hastalıktır. Kadın erkek oranı 1.7/1.0'dir. Hastalığın görüldüğü yaş sınırı belirgin olmamakla birlikte çoğu olgu 3. ve 4. dekatta görülmektedir [8].

PAH'ın Patofizyolojisi

PAH'ın gelişimi ve ilerlemesi, tek bir patolojik özellik ile açıklanamaz. Patolojik olarak PAH, vasküler yeniden şekillenme ve düz kas hipertrofisine bağlı olarak ortaya çıkabilecek pulmoner arterlerin daralması nedeniyle gelişmektedir. Bu daralma, kalbin pulmoner dolaşıma yeterli kan pompalamasını zorlaştırmaktadır. Bunun sonucu olarak, sağ ventrikül yükünün artmasına, sağ ventrikülün genişlemesine, artmış pulmoner vasküler direnç (PVR) ve dolaşımda oksijen eksikliğine neden olmaktadır.



Şekil 2. Pulmoner hipertansiyon patogenezinde etkili mekanizmalar

PAH ile ilişkili ölümlerin en önemli nedenlerinden biri sağ ventrikül yetmezliğidir [9]. PAH patogeneğinde mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler gibi hastalığın ilerlemesini kolaylaştıran genetik yatkınlıklar ve hipoksi, virüs ve anoreksik ajanlar gibi ileti yollarını etkileyen çevresel faktörler ile tetikleyici ajanlar bulunmaktadır (Şekil 2) [10].

PAH'da Klasik Tedavi Yaklaşımları

PAH tedavisinin temel amacı; hipertansiyonun derecesini azaltarak, olumsuz etkilenen sağ ventrikül fonksiyonlarını ve fonksiyonel kapasiteyi düzeltmek ve böylece hastanın yaşam kalitesini artırmak ve iyi bir prognoz sağlamaktır [7]. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından oral, inhale, subkutan ve intravenöz yollarla verilen onaylanmış tedaviler prostasiklin, endotelin ve nitrik oksit yollarını hedeflemektedir [4]. Tablo 2'de PAH tedavisi için onaylanmış etkin maddeler yer almaktadır [11].

Tablo 2. PAH tedavisi için onay almış etkin maddeler

Prostasiklin yolu	Endotelin yolu	Nitrik oksit yolu
Epoprostenol (iv)	Bosentan (oral)	Sildenafil (oral)
İloprost (inh, iv)	Ambrisentan (oral)	Tadalafil (oral)
Treprostinil (inh, iv, sc, oral)	Macitentan (oral)	Vardenafil (oral)
Beraprost (oral)		Riociguat (oral)
Selexipag (oral)		

iv:intravenöz, sc:subkutan, inh:inhale

Mevcut tedaviler PAH'lu hastaların yaşam kalitesinin iyileşmesini sağlamakla birlikte bazı eksikliklere sahiptir. Bu eksiklikler aşağıda özetlenmiştir.

- Tedavide kullanılan etkin maddeler çok kısa bir yarılanma ömrüne sahiptir, bu nedenle ilacın invazif yolla (intravenöz ve subkutan) sürekli infüzyon şeklinde uygulanması gerekmektedir.
- İlaçların uzun süreli kullanımını takiben ciddi yan etkilere sebep olan hedefleme (seçicilik) eksikliği vardır.
- Hastalığın ilerlemesini etkili bir şekilde engellemek için iki veya daha fazla yolun hedeflenerek tedavi edilmesi gerekmektedir [6].

Prostasiklin Yolu

Prostasiklin (PGI₂), endotelde ve düz kasta araşidonik asitten türetilen bir prostaglandindir. Trombosit agregasyonunu inhibe eden PGI₂ vazodilatör, anti-enflamatuvar, anti-trombotik ve anti-proliferatif etkilere sahiptir. PAH'da PGI₂ seviyesi ve sentezi azalmakta, bu da hastalıkta görülen vazokonstriksiyon ve trombosit agregasyonuna katkıda bulunmaktadır. PAH'da bu eksikliği gidermek için tedavide prostasiklin analogları kullanılmaktadır [12]. Prostasiklin analogları olarak poprostenol (Veletri®, Flolan®), iloprost, treprostinil, beraprost (Dorner®) ve Aralık 2015'de FDA tarafından onaylanan prostaglandin I reseptör agonistlerinden seleksipag (Upravi®) kullanılmaktadır [5]. İloprost

(Ventavis®) ve treprostiniil (Tyvaso®) inhalasyon çözeltisi olarak onaylanmıştır, buna ek olarak treprostiniil (Remodulin®, Orenitram® uzatılmış salım yapan tabletler) için oral tablet olarak da onaylanan preparatlar mevcuttur. Beraprost ise Japonya ve Kore’de kullanım için onaylanmıştır [6]. PAH tedavisinde kullanılan prostasiklin analoglarının bazı kısıtlamaları Tablo 3’te verilmiştir [6].

Tablo 3. Prostatiklin analoglarının kullanımını kısıtlayan faktörler

Epoprostenol	Kısa yarı ömür (3-5 dk) Asidik pH’da stabil değil Oral kullanıma uygun değil
Treprostiniil	İnfüzyon bölgesinde ağrı ve sertlik
İloprost	Yarı ömür 20-25 dk Günlük 6-9 inhalasyon
Beraprost	Eliminasyon yarı ömrü 35-40 dk
Seleksipag	Zayıf çözünmeden dolayı oral biyoyararlanım düşük

PAH’da prostasiklin analoglarıyla tedavide karşılaşılan sorunları ortadan kaldırarak daha etkili bir tedavi sağlamak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Ishihara ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, beraprost sodyum içeren nanopartiküllerin sürekli salım özelliklerini, hedefleme yeteneklerini ve farmakolojik aktivitelerini incelemiştir. Beraprost nanopartikülleri poli(laktik asit) (PLA) homopolimeri ve monometoksi poli(etilen glikol)-PLA blok kopolimerleri kullanılarak su içinde yağ çözücü difüzyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküller; partikül büyüklüğü, yükleme etkinliği, in vitro salım, PAH’lı hayvan modellerinde vasküler geçirgenlik, kanda nanopartiküllerin belirlenmesi ve in vivo ortamda nanopartiküllerin birikimi açısından değerlendirilmiştir. Hasarlı pulmoner arterlerde nanopartiküllerin birikimi floresan özellikteki rodamin S içeren nanopartiküller kullanılarak incelenmiştir. Beraprost yüklü nanopartiküllerin farmakolojik aktivitelerinin incelemesinde monokrotalin ile indüklenmiş PAH sıçan modeli ve hipoksi ile indüklenmiş fare modelleri kullanılmıştır. Beraprost, PLA nanopartiküllerine uygun pH koşullarında ve demir klorür varlığında yüklenmiştir. Beraprostun sürekli salım profillerini ve kanda kalış sürelerini optimize etmek için çeşitli PEG-PLA ve PLA kombinasyonları test edilmiş ve düşük molekül ağırlıklı PLA ile hazırlanan nanopartiküllerde daha hızlı salım profili ve daha hızlı klirens gözlenmiştir. Monokrotalinle indüklenmiş PAH modeli sıçanlara rodamin S nanopartiküllerinin uygulanması sonucu hasarlı pulmoner arterlerde birikim gözlenmiştir ve bu birikimin muhtemelen EPR etkisinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlar intravenöz olarak uygulanan beraprost yüklü nanopartiküllerin PAH hastalarında hasarlı arterlere seçici olarak iletilebileceğini göstermiştir. İntravenöz olarak uygulanan beraprost yüklü nanopartiküllerin farmakolojik etkisi oral yoldan uygulanan beraprost ile karşılaştırılmıştır. Haftada bir kez intravenöz beraprost nanopartiküllerinin uygulamasıyla (20 µg BPS/kg) iyileşme derecesi tek başına beraprostun (100 µg/kg) günlük oral uygulamasıyla elde edilene benzer bulunmuştur. Bu sonuçlar, beraprost nanopartiküllerinin, etkili beraprost dozunun azaltılmasını ve daha az uygulama sıklığının kullanılmasını mümkün kıldığını göstermiştir [13].

Leifer ve arkadaşları, treprostininin ön ilaç formunu lipit nanopartiküllere yükleyerek inhalasyon yoluyla kullanım için bir formülasyon tasarlamışlardır. Treprostininin kısa yarı ömrü nedeniyle oral ve inhalasyon yoluyla çok sık kullanılmasını engellemek ve akciğerler ve plazmadaki yüksek ilaç konsantrasyonundan kaynaklanan bazı yan etkilerin önüne geçebilmek için bu çalışma gerçekleştirilmiştir. Öncelikle treprostininin ön ilaç şekli tasarlanmış ve bu ön ilacın sağlıklı hayvanlardan alınan akciğer dokularında treprostininle dönüşümü incelenmiştir. Daha sonra, treprostinin ön ilacı etanol enjeksiyon yöntemi kullanılarak lipit nanopartiküllere yüklenmiştir. Nanopartiküllerin hazırlanmasında lipit olarak skualen, 1,2-dioleil-sn-glisero-3-fosfokolin (DOPC) ve kolesterol-PEG 2000 kullanılmıştır. Nanopartiküllerin büyüklükleri dinamik ışık saçılımı yöntemi kullanılarak tayin edilmiş, morfolojileri ise geçirimsiz elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmiştir. Yapılan incelemelerde nanopartiküllerin ortalama 100 nm büyüklüğünde olduğu bulunmuştur. Amfifilik DOPC ve Kolesterol-PEG 2000'nin nanopartikül yüzeyinde bulunup stabilizasyonu sağlarken, nanopartiküllerin %80'ini oluşturan treprostinin ön ilacının ve skualenin hidrofobik bir çekirdek oluşturduğu düşünülmektedir. Çalışma kapsamında birçok ön ilaç ve bu ön ilaçları içeren birçok lipit nanopartikül oluşturulmuştur. Hazırlanan nanopartiküller pulmoner vazokonstriktif sıçan modellerinde inhale treprostinin çözeltisi ile karşılaştırılmış ve farmakokinetik verilerin iyileştiği gözlenmiştir. Optimum nanopartikül formülasyonu inhale treprostinin ile karşılaştırıldığında sıçan hipoksisi modelinde pulmoner vazokonstriksiyonda uzatılmış bir vazodilatör etki gözlenmiştir [14].

Jain ve arkadaşları, ilaç verimliliğini artırmak için iloprost için lipozomal nanopartiküller sentezlemişler ve fare intrapulmoner arterleri üzerindeki farmakolojik etkinliğini değerlendirmişlerdir. Lipozomlar ince film hidrasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Lipozomlarda katyonik lipidler, stearylamin veya 1,2-di-(9Z-oktadesenoil)-3-trimetilamonyum-propan (DOTAP) kullanımı iloprost enkapsülasyonunu en az % 50 artırırken, kolesterol ilavesi, iloprost enkapsülasyonunu azaltmıştır. Hazırlanan iloprost lipozomları, insan pulmoner arter düz kas hücrelerinin canlılığını etkilememiştir. Eşdeğer bir serbest iloprost konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında, polimer kaplı lipozomal formülasyonlar fare pulmoner arterlerinde önemli ölçüde artmış vazodilatasyon sergilemiştir. Polimer olarak polietilen glikol kullanılan lipozomlar içinde enkapsüle edilmiş olan iloprost, arterlerde konsantrasyona bağlı gevşeme göstermiştir. Çalışmanın sonuçları katyonik lipozomların iloprostu yüksek etkinlik ile enkapsüle edebildiğini ve terapötik etkinliği iyileştirmek için potansiyel iloprost taşıyıcısı olarak kullanılabilirliklerini düşündürmüştür [15].

Alwan ve arkadaşları, absorpsiyon için hız sınırlayıcı bir adım olarak kabul edilen zayıf çözünürlük nedeniyle düşük oral biyoyararlanıma sahip seleksipag ile bir çalışma yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada seleksipagın çözünürlüğünü ve çözünme hızını artırmak amacıyla sert jelatin kapsüllere doldurulmuş seleksipag nanokristalleri hazırlamış ve karakterize etmişlerdir. Seleksipag nanokristalleri; polimerik stabilizatör olarak HPMC E5, PVA, Soluples®, PXM-407 polimerleri ile asit-

baz nötralizasyon ve presipitasyon-ultrasonikasyon yöntemleri ile hazırlanmıştır. Seleksipag nanokristallerinde en stabil ve uygun formülü seçmek için stabilizatör tipi ve hazırlama yöntemlerinin nanokristallerin partikül boyutu ve polidispersite indeksi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Liyofilize nanokristallerde de etken madde içeriği, redisperse edilebilirlik, akışkanlık, sıkıştırılabilirlik özellikleri gibi karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda hazırlanan seleksipag nanokristalleri, saf seleksipaga göre birkaç kat artmış doygunluk çözünürlüğü göstermiştir. Liyofilize seleksipag nanokristalleri içeren sert jelatin kapsüller, saf seleksipag içeren sert jelatin kapsüllere göre daha hızlı bir çözünme profili sergilemiştir [16].

Endotelin yolu

Endotelin, insanlarda ET-1, ET-2 ve ET-3 olmak üzere üç ayrı formda bulunmaktadır. ET-1 primer olarak damar endotelinden salgılanan, kuvvetli ve uzun süreli vazokonstriksiyon sağlayan bir ajandır. Nötrofil ve mast hücrelerinden sitokin salımını uyarmak suretiyle enflamasyonu tetiklemektedir. Ayrıca damar düz kas hücrelerinde ve fibroblastlarda proliferasyona yol açmaktadır [17]. ET-1'in düz kas hücrelerinde endotelin reseptörlerine (ETA ve ETB) bağlanması fosfolipaz C'yi aktive etmekte, bu da hücre içi kalsiyumu artırmakta ve sürekli vazokonstriksiyona neden olmaktadır. PAH teşhisi konan hastalarda hem plazma hem de akciğer dokularında ET-1 aktivasyonu arttığı için yüksek ET-1 seviyelerinin hastalık şiddeti ve prognozu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle PAH tedavisinde ET_A ve ET_B'yi bloke eden çeşitli bileşikler geliştirilmiştir [18]. Üç endotelin reseptör antagonisti; bosentan (Tracleer®), ambrisentan (Letairis®) ve macitentan (Opsumit®) PAH tedavisi için FDA ve EMA tarafından onaylanmıştır. Başka bir endotelin reseptör antagonisti olan sitaksentan Avustralya, Kanada ve Avrupa Birliği'nde onaylanmış, ancak Aralık 2010'da endotelin reseptör antagonistleri ile ilişkili terminal bir yan etki olan ölümcül karaciğer hasarı raporları doğrultusunda piyasadan ve klinik çalışmalardan çekilmiştir [6].

PAH tedavisinde kullanılan endotelin reseptör antagonistlerinin bazı kısıtlamaları Tablo 4'te verilmiştir [6].

Tablo 4. Endotelin reseptör antagonistlerinin kullanımını kısıtlayan faktörler

Bosentan	Karaciğer toksisitesi (hepatik aminotransferaz artışı)
Ambrisentan	Teratojenite Karaciğer toksisitesi
Macitentan	Teratojenite

Anjaneyulu ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, bosentanın PAH tedavisinde sistemik yan etkilerini en aza indirmek için Pulsincap formülasyonu tasarlamıştır. Bosentan ve diğer formülasyon bileşenlerinin karışımları için Hausner oranı ve Carr indeksi hesaplanarak mikromeritik özellikleri incelenmiştir. Çalışmada şeker pelletleri bosentan ile kaplanmıştır. Şeker pelletleri etkin madde ile kaplanmadan önce sudaki çözünürlüklerini azaltmak için %2 a/a hidroksipropil metil selüloz (HPMC)

ile kaplanmıştır. Daha sonra akışkan yatak cihazı kullanılarak etkin madde bulamacıyla kaplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan bosentan kaplı pelletler %2'den az nem içerecek şekilde 45 °C'de kurutulmuştur. Pulsincap formülasyonlarını geliştirmek için boş sert jelatin kapsüller kullanılmış ve bu sert jelatin kapsüller formaldehit ile kaplanmıştır. Kapsüller için HPMC K10, guar zıncı, ksantan zıncı ve sodyum aljinat gibi şişebilen polimerleri ve farklı oranlarını içeren tıplar hazırlanmıştır. Hazırlanan formaldehit kaplı kapsüllerin içerisine 62,5 mg bosentana eşdeğer olacak şekilde pelletler koyulmuş ve şişebilen tıplarla kapatılarak Pulsincap sistemleri hazırlanmıştır. Hazırlanan Pulsincap sistemlerinin in vitro salım özellikleri incelenmiştir. İn vitro salım çalışmaları USP Aparat 1 (sepet yöntemi) kullanılarak 12 saat boyunca 50 rpm dönüş hızında ve 37°C'de gerçekleştirilmiştir. Ortam olarak ilk 2 saat pH 1.2, sonraki 3 saat pH 7.4 fosfat tamponu ve devamında pH 6.8 fosfat tamponu kullanılmıştır. Yapılan salım çalışması sonucunda Pulsincap formülasyonlarından 3 saat sonra bosentan salımı olduğu gözlenmiş ve 12 saat boyunca devam eden bir salım profili sergilemiştir. Yapılan çalışma sonucunda Pulsincap formülasyonundan bosentan salımının tıpadaki hidrojel konsantrasyonu ile orantılı olduğu görülmüştür. Artan hidrojel konsantrasyonu ile mide ortamında etkin madde salımının azaldığı ve bağırsak ortamında ise kontrollü etkin madde salımının sağlanabileceği bulunmuştur. Sonuç olarak, bosentanın geliştirilen Pulsincap formülasyonu ile başarılı bir şekilde kontrollü salımının sağlanabildiği görülmüştür [19].

Deshmane ve arkadaşları yaptıkları çalışmada suda çözünürlüğü zayıf olması nedeniyle oral biyoyararlanımı düşük olan ambrisentan için ilaç taşıyıcı sistem olarak doğal *Daucus carota* ekstresi kullanılarak katı dispersiyonları hazırlanmıştır. *Daucus carota* ekstresi sıcak su ekstraksiyonu ile elde edilmiş ve çözünürlük, şişme indeksi, viskozite, yığın açısı, hidrasyon kapasitesi ve akut toksisite testi (LD₅₀) açısından değerlendirilmiştir. Oluşturulan katı dispersiyonlar etken madde içeriği, çözünürlük, morfoloji ve in vitro salım çalışmaları ile karakterize edilmiştir. Katı dispersiyonlar ile saf ambrisentanın in vivo biyoyararlanım çalışmaları farelere oral uygulama sonucu değerlendirilmiştir. C_{max}, t_{max}, AUC, MRT gibi farmakokinetik parametreler katı dispersiyonu oluşturulan ambrisentanın hızlı çözüldüğünü ve emildiğini göstermiştir. Çalışma sonucunda, doğal *Daucus carota* ekstresinin çözünürlüğü ve biyoyararlanımı iyileştirmek için katı dispersiyon ve/veya diğer dozaj formlarının hazırlanması için iyi bir alternatif kaynak olabileceği düşünülmüştür [20].

Nitrik oksit yolu

Nitrik oksit (NO) endojen bir vazodilatördür ve fizyolojik koşullar altında antiproliferatif ve antienflamatuvar etkiler dahil olmak üzere birçok etkisi bulunmaktadır [21]. NO, düz kas kasılmasını düzenleyen önemli bir ikinci haberci olan siklik guanozin monofosfat (cGMP) üretimini artırmaktadır [6]. NO sentezinin ve NO-çözünabilir guanilat siklaz (sGC)-cGMP yolu arasındaki sinyal iletiminin bozulması PAH patogenezinde rol oynamaktadır [22]. İn hale NO, PAH tedavisi için potansiyel bir terapötik yaklaşım olarak araştırılmış ve hastanede yatan pediatrik PAH hastalarının tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır [6]. NO'nun etkisini belirginleştirerek etki gösteren fosfodiesteraz-5

inhibitörleri, PAH tedavisinde umut vaat eden bir başka gruptur [17]. Bu gruba dahil olan sildenafil (Revatio®) ve tadalafil (Adcirca®) FDA tarafından PAH tedavisi için onaylanmıştır. NO, cGMP üretimini artırarak etki ettiği için cGMP biyosentezini uyaran ilaçlar da PAH tedavisinde etkili olabilmektedir. sGC uyarıcılarına örnek olan Riociguat (Adempas®) PAH tedavisi için onaylanmış bir diğer ilaçtır [6].

PAH tedavisinde NO yolağında kullanılan ilaçların bazı kısıtlamaları Tablo 5'te verilmiştir [6].

Tablo 5. Nitrik oksit yolağında kullanılan etkin maddelerin kullanımını kısıtlayan faktörler

Sildenafil	Retina kanaması Doza bağlı sistemik yan etkiler
Tadalafil	Doza bağlı sistemik yan etkiler
Vardenafil	Düşük çözünürlük İlk geçiş etkisi

Bu grupta bulunan sildenafil sitratın oral ve intravenöz uygulama için çeşitli piyasa preparatları bulunmaktadır. Ancak bu preparatlar kısa yarılanma ömrü, başta hipertansiyon ve baş ağrısı olmak üzere sistemik yan etkiler gibi olumsuz özellikler göstermektedir. Bu olumsuz özelliklerin üstesinden gelmek ve kontrollü salım elde etmek için çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla Shahin ve arkadaşları sildenafil sitratın sürekli pulmoner salımı için hidrojel mikropartiküller tasarlamış ve değerlendirmiştir. Çalışmada değişen oranlarda mukoadesif, biyoyumlu ve biyobozunur özellikler gösteren sodyum karboksimetil selüloz, sodyum aljinat ve sodyum hiyalüronat polimerleri kullanılarak püskürterek kurutma tekniğiyle hidrojel mikropartiküller oluşturulmuştur. Bu mikropartiküllerde partikül büyüklüğü, partikül büyüklüğü dağılımı, üretim verimi, yükleme etkinliği, in vitro salım, şişme, biyodegradasyon, nem içeriği, in vitro aerodinamik çap ve sitotoksisite gibi karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, sıçanlarda oral yoldan verilen Viagra® ile karşılaştırmalı olarak hidrojel mikropartiküllerinin intratrakeal olarak uygulanmasını takiben akciğer birikimi ve farmakokinetik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar polisakarit polimerlerinin değişik konsantrasyonları ve bileşimleriyle hazırlanan hidrojel mikropartiküllerinin yüksek verimi, yüksek yükleme etkinliği, uygun partikül boyutu ve 24 saat boyunca uzatılmış salım özelliğine sahip olduğunu göstermiştir. Hidrojel mikropartikül formülasyonlarının in-vivo değerlendirilmesi, akciğerlerde birikim açısından umut verici sonuçlar vermiş ve ticari sildenafil sitrat tabletleriyle karşılaştırıldığında ilacın eliminasyon yarı ömrünü uzattığı gözlenmiştir. Bu nedenle, formüle edilebilen püskürterek kurutulmuş hidrojel mikropartiküllerin, PAH tedavisi için günde bir kez pulmoner yol ile uygulanabilecek potansiyel bir ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilmesi düşünülmüştür [23].

Lila ve arkadaşları, tadalafil ve sildenafil'den daha seçici ve on kat daha güçlü bir başka fosfodiesteraz-5 inhibitörü olan vardenafil ile bir çalışma yapmışlardır. Vardenafil oral uygulamadan sonra düşük çözünürlük ve ilk geçiş metabolizması nedeniyle düşük biyoyararlanıma sahiptir. Bu

nedenle çalışmada vardenafil katı dispersiyonları hazırlanarak çözünme hızını artırmak ve ilk geçiş etkisinden kaçınmak için pastil dozaj formu tasarlanmıştır. Hazırlanan bu pastillerde; ağırlık varyasyonu, sertlik ve kalınlık, erozyon süresi, yükleme kapasitesi, friabilite, yüzey pH'sı ve in vitro salım çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca in vivo değerlendirme, sıçanlarda optimize edilmiş formülün vardenafil oral süspansiyonuna karşı biyodağılım ve cGMP serum seviyesinin ölçülmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir. Pastillere vardenafil saf etken madde ve katı dispersiyonları olmak üzere iki farklı şekilde yüklenmiş ve karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Vardenafil katı dispersiyonları 1:1 oranında tartarik asit kullanılarak çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Belirli miktarlarda tartılan vardenafil ve tartarik asit metanol içinde çözülmüş ve daha sonra metanol 40°C sıcaklıkta vakum altında uzaklaştırılmıştır. Buharlaştırma sabit bir ağırlık elde edilinceye kadar devam ettirilmiş ve oluşan katı dispersiyonlar vakumlu fırında kurutularak toz edilmiş ve elekten geçirilmiştir. Pastiller ise eritme ve sıkıştırma tekniği ile hazırlanmıştır. Tozlar düzgün bir karışım oluşturmak üzere karıştırıldıktan sonra PEG karışımı bir beher içinde eritilmiş ve hazırlanan toz karışımı içerisine ilave edilip karıştırılmıştır. Karışım 50° C'nin altına soğutulmuş ve hazırlanacak formülasyona göre ya vardenafil ya da vardenafil katı dispersiyonu ilave edilip karıştırılmıştır. Formülasyonlara sedimantasyonu önlemek için silika jel ilave edilmiştir. Son olarak hazırlanan karışım kalıplara dökülmüş ve soğumaya bırakılmıştır. Pastillerde in vitro salım çalışmaları USP aparat II kullanılarak 100 mL pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde 50 rpm ve 37±0.5 °C'de 1 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Salım çalışması sonucunda vardenafil katı dispersiyonlarıyla hazırlanan pastillerden serbest vardenafil içeren pastillere göre artmış bir salım gözlenmiştir. Çalışmanın sonucunda vardenafil katı dispersiyon pastillerinin PAH tedavisi için oral vardenafil süspansiyonuna potansiyel bir alternatif olabileceği kanısına varılmıştır. Hazırlanan pastiller vardenafilin oral emilimini artırarak ve ilk geçiş etkisini önleyerek biyoyararlanımının artmasını ve akciğerlerde lokalize olmasını sağlamışlardır [24].

Rad ve arkadaşları yaptıkları çalışmada sistemik yan etkileri azaltmanın yanı sıra biyoyararlanımı ve tedavi etkinliğini artırmak için pulmoner yol ile uygulanmak üzere tadalafil nanokompozitlerini püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlamışlardır. Hazırlanan nanokompozitlerde, partikül boyutu, morfolojisi, kristallliği, yoğunluğu, çözünürlüğü, yeniden dağılılabirliği ve in-vitro inhalasyon performansı açısından karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Optimum formülasyon küresele yakın şekle ve 13.7 kat artmış çözünme oranı, % 57.2 ± 6.5 ince partikül fraksiyonu, 1.4 g/cm³ yoğunluk, 3.2 µm aerodinamik çapa sahip stabil amorf partikülleri içermektedir. Farmakokinetik parametreler intratrakeal insüflasyondan sonra sıçanların plazma ve akciğer dokusunda değerlendirilmiş ve piyasada bulunan oral tadalafil preparatı ile karşılaştırılmıştır. In-vivo çalışmalar, intratrakeal insüflasyondan sonra tedavi edilen grupta elde edilen AUC_{0-24saat} akciğer/AUC_{0-24saat} plazma oranının kontrol grubundan anlamlı derecede daha yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca, plazma veri analizi ile belirlenen ve geleneksel oral yolla karşılaştırıldığında tadalafil nanokompozitlerin intratrakeal insüflasyonundan

sonra elde edilen yüksek MRT (2.3 kat) ve t_{max} (3.7 kat) değerleri akciğerlerde tadalafil moleküllerinin daha uzun süre tutulduğunu ve sistemik kan dolaşımına daha yavaş katıldığını göstermiştir. Yapılan çalışma, tadalafil nanokompozitlerin kullanıldığı inhalasyon tedavisinin, hızlı etki başlangıcı, daha yüksek bir lokal ilaç konsantrasyonu, daha uzun bir ilaç retansiyonu ve sonuç olarak, tadalafilin geleneksel oral uygulamasına kıyasla akciğerlere etkili bir ilaç iletimi avantajları sunduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, önerilen formülasyonun etkinliğinin doğru bir şekilde değerlendirilmesi için daha fazla toksikolojik, farmakolojik ve klinik çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür [25].

PAH'da Kombinasyon Tedavileri

PAH'ın başlangıç tedavisinden sonra yapılan klinik değerlendirmede klinik yanıt yeterli değilse kombinasyon tedavisi alternatif olarak kullanılabilir. Kombinasyon tedavisinde iki ya da daha fazla sınıftan ilaç birlikte kullanılmaktadır [22]. PAH tedavisinde kullanılan ilaçların değişik yollardan etki etmesi ile sinerjistik etki sağlanabilmesi açısından kombinasyon tedavileri avantaj sağlayabilmektedir [26]. Kombinasyon tedavisi; endotelin reseptör antagonistleri, fosfodiesteraz-5 inhibitörleri, prostanoidler ve yeni bileşikler gibi PAH hedefli birden fazla ilaç sınıfının eş zamanlı kullanımını içermektedir. Farklı randomize ve kontrollü çalışmalarda; bosentan-epoprostenol, bosentan-iloprost, bosentan-sildenafil, sildenafil-epoprostenol gibi kombine tedavilerin etkinlikleri gösterilmiştir. Yeni keşfedilen bileşiklerle yapılan çalışmalar devam etmektedir [27].

Kombinasyon tedavisinde iki yaklaşım mevcuttur. İlki tek bir grup ilaçla tedaviye başlanmasını ancak tedavi hedeflerine ulaşılmadığında ikinci grup ilacın tedaviye eklenmesini içermektedir. Diğer yaklaşım ise tedaviye doğrudan kombine ilaç kullanımı ile başlanmasıdır [28]. Kombinasyon tedavisiyle tedavi etkinliğinin artması sağlanmakla birlikte birçok ilaç-ilaç etkileşimi de görülebilmektedir. Örneğin bosentan sitokrom P450 izoenzimleri CYP3A4 ve CYP2C9'u indükleyici etki yapmakta ve bu izoenzimler tarafından metabolize olan ilaçların bosentan ile birlikte verilmesi durumunda plazma konsantrasyonlarında düşüş görülmektedir [29].

PAH'da Güncel Tedavi Yaklaşımları

PAH patofizyolojisinden sorumlu hücrel ve moleküler mekanizmalar hakkındaki bilgiler gün geçtikçe artmaktadır. PAH'da pulmoner vasküler yatakta ilerleyen mekanik tıkanmanın, mPAP'ın yükselmesinden büyük ölçüde sorumlu olduğu belirlenmiştir. Pulmoner vasküler yeniden şekillenmenin altında yatan temel fizyopatolojik mekanizmalar arasında pulmoner vazokonstriksiyon, in situ tromboz, medial hipertrofi ve kompleks vasküler lezyonların oluşumu bulunmaktadır. PAH'ta bu aşırı yeniden şekillenmeye katkıda bulunan; artan hücre proliferasyonu ve pulmoner arteriyel düz kas hücrelerinin, endotel hücrelerinin, fibroblastların ve miyofibroblastların azalmış apoptozu, pulmoner endotelial disfonksiyon, sürekli enflamasyon, metabolik değişiklikler ve oksidatif stres ve farklı sinyal yollarının aşırı aktivasyonu gibi mekanizmalar ortaya çıkmıştır [30].

Anti-PAH ilaçları bazı durumlarda etkisiz veya daha az terapötik potansiyele sahip olabilmektedir. Bu nedenlerle ve yukarıda bahsedildiği gibi patogeneizde elde edilen yeni bilgiler ışığında PAH tedavisinde yeni terapötik yaklaşımlar oluşmaktadır. Bu yaklaşımlar içinde; rho-kinaz yolu, tirozin kinaz, vazoaaktif intestinal peptitler, endotelin progenitör hücreleri ve miRNA'ların kullanımı üzerinde en çok çalışılan yaklaşımlardır [6].

Rho-kinaz yolu

Son yıllarda, PAH tedavisi için belirlenen ümit verici hedefler arasında rho-kinaz bulunmaktadır. 1990'larda tanımlanan rho-kinazların ROCK-1 ve ROCK-2 olmak üzere iki izoformu tanımlanmış ve arterlerde eksprese edildiği bulunmuştur [31, 32]. Rho-kinaz, proliferasyon, apoptoz, kasılma ve gen ekspresyonu gibi çeşitli hücre fonksiyonların düzenlenmesinde rol almaktadır. Rho-kinazlar, düz kas hücrelerinin kasılmasında Ca^{+2} duyarlılığının düzenlenmesindeki temel rolleri sayesinde arteriyel tonunun önemli bir belirleyicisi olarak kabul edilmektedirler. Ayrıca, endotelial nitrik oksit sentaz ekspresyonunu ve aktivitesini negatif olarak kontrol etmekte ve trombosit agregasyonuna katılmaktadırlar [32]. Birçok çalışma ROCK'un uyarılmasının PAH'da meydana gelen sürekli vazokonstriksiyon, vasküler yeniden şekillenme ve iltihaplanmada rol aldığını göstermiştir [33]. Rho-kinaz inhibitörleri, fasudil ve aminofurozan türevleri gibi ROCK'u doğrudan inhibe edenler ve statinler gibi dolaylı inhibitörler olmak üzere iki kategoride sınıflandırılabilir [6].

Gupta ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, aerosolize lipozomlara yüklenmiş fasudilin PAH'da uzun süreli ve pulmoner olarak seçici vazodilatasyon sağlamak amacıyla uygulanabilirliğini araştırmışlardır. Lipozomlar film hidrasyon ve ekstrüzyon yöntemleriyle hazırlanmıştır. Lipozom formülasyonlarında, 1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfokolin ve kolesterol 7:3 mol oranında ve toplam lipit konsantrasyonu 30 mM olacak şekilde kullanılmıştır. Fasudil lipozomlara pasif veya aktif olarak yüklenmiştir. Pasif yükleme durumunda, fosfat tamponu içerisinde 15 mg/mL oranında bulunan fasudil çözeltisi ile lipitlerden oluşan film tabakası rehidrate edilmiş ve 25 °C'de bir saat sonike edilmiştir. Bunun sonucunda oluşan büyük çok tabakalı veziküller 65 °C'de ekstrüzyon işlemine tabi tutulmuş ve küçük tek tabakalı veziküller elde edilmiştir. Yüklenmemiş ilaç ise lipozomların kolondan geçirilmesiyle ayrılmıştır. Aktif yükleme durumunda ise, film tabakası değişik pH'larda (3.0, 5.4, 7.0 ve 8.0) 250 mM amonyum sülfat çözeltisi ile rehidrate edilmiş ve lipozomlar pasif yüklemede olduğu gibi ekstrüde edilmiştir. Ardından fasudil, 65 °C'de 30 dakika boyunca amonyum sülfat içeren lipozomlar ile inkübe edilerek yüklenmiş ve yüklenmeyen fasudil yine bir kolondan geçirilerek uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan lipozomlar çeşitli fizikokimyasal özellikleri için karakterize edilmiştir. Optimize edilen formülasyonlar, monokrotalin ile indüklenmiş PAH sıçan modelinde pulmoner absorpsiyon ve farmakolojik etkinliği açısından test edilmiştir. Lipozomların ortalama vezikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli Malvern Zetasizer kullanılarak belirlenmiş ve lipozomal formülasyonların morfolojisi TEM ile incelenmiştir. İn vitro salım çalışmaları, diyaliz yöntemiyle

gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda, lipozomların fasudilin pulmoner yoldan verilmesi için bir taşıyıcı olarak kullanılabilmesi ve lipozomal fasudilin in vivo olarak sıçanlara uygulandığında uzatılmış bir yarı ömür gösterdiği bulunmuştur. İntravenöz fasudil ile karşılaştırıldığında optimize edilmiş lipozomal formülasyonların tek bir dozu yaklaşık 3 saat boyunca sürekli pulmoner vazodilatasyon sağlamıştır. Sonuç olarak aerosol haline getirilmiş fasudil lipozomlarının düşük dozlama sıklığında sürekli ve seçici pulmoner vazodilatasyon için PAH tedavisinde kullanılabilmesi düşünülmüştür [34].

Tirozin kinaz

Protein kinazın bir alt sınıfı olan tirozin kinaz, ATP'nin terminal fosfatını bir proteine aktararak tirozin kalıntılarının fosforilasyonunu tetikleyen bir enzimdir [6]. Reseptör tirozin kinazlar büyüme faktörleri ve hücre dışı sinyal molekülleri için reseptör görevi gören transmembran glikoproteinlerdir. Reseptör tirozin kinazlar çoğalma, hücre sel göç, metabolizma, farklılaşma ve hücre sel hayatta kalma olaylarında önemli bir rol oynarlar [35]. Çalışmalar, tirozin kinaz reseptörlerinin PAH patogenezinde önemli bir rol oynadığını ve bazı spesifik reseptör tirozin kinaz sinyallerinin inhibisyonunun PAH tedavisinde etkin olduğunu göstermiştir. 2007 yılında FDA tarafından metastatik meme kanseri tedavisi için onaylanmış olan lapatinib ile hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda, uyarılmış pulmoner hipertansiyonu azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, insanlardaki etkisi için klinik veri bulunmamaktadır [36]. Bir diğer tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib (Gleevec®), hücre sel proliferasyonu inhibe ederek ve pulmoner arteriyel düz kas hücrelerinin apoptozunu artırıp vasküler yeniden şekillenmeyi tersine çevirerek anti-PAH aktivitesi göstermiştir. Bu etkinin PDGF reseptörü için inhibitör etkisinden kaynaklandığı varsayılmaktadır. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve c-kit reseptörlerinin PAH patogenezinde kritik bir rol oynadığı ve vasküler endotelial hücrelerin ve düz kasların aşırı proliferasyonunda ve migrasyonunda yer aldıkları bildirilmiştir [6].

PDGF-reseptör tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib, PAH tedavisinde hemodinamiği iyileştirmekle birlikte ciddi yan etkiler görülmektedir. Nanopartikül kullanımı, etkin maddenin etkilerini korurken yan etkilerin azaltılmasını sağlamıştır. Akagi ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada sıçan modelinde ve insan PAH-pulmoner arteriyel düz kas hücrelerinde (PASMC) imatinib yüklü nanopartiküllerin etkinliğini incelemiştir. Flurosein izotiyonat (FITC) ve imatinib yüklü poli(laktik-koglikolik asit) (PLGA) nanopartikülleri emülsifikasyon-çözücü difüzyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Nanopartiküllerin hazırlanmasında molekül ağırlığı 22 900 ve 75:25 laktik asit-glikolik asit kopolimer oranına sahip PLGA kullanılmıştır. PLGA, aseton-metanol karışımı içerisinde çözülüp içerisine FITC/imatinib ilave edilmiştir. Fosfat tamponu ve FITC nanopartiküllerinin MCT kaynaklı PAH sıçan modellerine tek bir intratekal uygulanmasını takiben sağ ventrikül sistolik basıncında ve sağ ventrikül hipertrofinde bir artış gözlenirken imatinib yüklü nanopartiküller ile sağ ventrikül sistolik basıncındaki artışın ve sağ ventrikül hipertrofinin önlenmesi görülmüştür. Ayrıca imatinib yüklü

nanopartiküllerin uygulanması küçük damarların oluşum yüzdesini de azaltmıştır. FITC nanopartiküllerinin MCT kaynaklı sıçan modellerindeki dağılımı incelendiğinde ise pulmoner arterlere dağılım gözlenirken; karaciğer ve böbrekte dağılım gözlenmemiştir. İmatinib ve imatinib yüklü nanopartiküllerin PAH'lı pulmoner arteriyel düz kas hücrelerindeki proliferasyonu değerlendirilmiştir. Her iki uygulama da proliferasyonu inhibe etmiştir. Ancak nanopartikül uygulanması daha uzun süreli bir inhibisyon sağlamıştır. Ayrıca, imatinibin nanopartiküllere yüklenmesi daha düşük dozda terapötik etki elde edilebilmesini sağlamıştır. İmatinib yüklü nanopartiküller sayesinde PAH-PASMC'lerin proliferasyonu ve MCT kaynaklı pulmoner hipertansiyon gelişiminin bastırıldığı gözlenmiştir [37].

Vazoaktif intestinal peptit

Molekül ağırlığı 3326 Da olan ve 28 aminoasitten oluşan vazoaktif intestinal peptit (VIP) bağırsaktaki su ve elektrolit sekresyonunda önemli bir rol oynayan nöroendokrin bir hormondur. VIP güçlü bir sistemik vazodilatör etkiye sahiptir. Monokrotaline bağlı pulmoner hipertansif tavşanlarda ve sağlıklı bireylerde pulmoner arter basıncını ve pulmoner vasküler direnci azaltmış, ayrıca trombosit aktivasyonunu ve vasküler düz kas hücresi proliferasyonunu inhibe etmiştir [38]. PAH hastalarında serumda VIP konsantrasyonunun düşük olduğu ama VIP reseptörlerinin ekspresyonunda artış olduğu bulunmuştur. Bu nedenle VIP'in PAH tedavisinde kullanılmasına ilgi gün geçtikçe artmaktadır [39].

VIP'lerin pulmoner yol ile uygulanması, astım ve PAH gibi çeşitli akciğer hastalıkları için umut verici bir tedavi seçeneğidir. Ancak, peptitlerin solunum yollarındaki hızlı enzimatik bozunmaya bağlı olarak kısa yarı ömrüne sahip olmaları bu tedavinin kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu sorunun üstesinden gelmek için Hajos ve arkadaşları, tek tabakalı nano boyutlu VIP yüklü lipozomlar (VLL) geliştirerek inhalasyon yolu ile uygulanabilirliğini araştırmışlardır. Boş ve VIP yüklü lipozomlar, konjuge polietilenglikol (PEG)-fosfatidil etanolamin, lizosteril-fosfatidilgliserol ve palmitoil-oleil-fosfatidilkolin kullanılarak ince film rehidrasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Yüzeğe bağlı VIP moleküllerini solunum yolundaki enzimatik bozulmaya karşı korumak ve partikül agregasyonunu engellemek için lipozomlar PEG ile kaplanmıştır. VIP'in damarlar üzerindeki vazodilatör etkisini araştırmak için sıçanlardan alınan arterler üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Serbest VIP ve VIP yüklü lipozomlar karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, lipozomlardan VIP salımı daha uzun süre sürmüş ve buna bağlı olarak arterlerde oluşturdukları vazodilatasyon süresi daha uzun gözlenmiştir [40].

Endotelin progenitör hücreleri

Prostanoidler, endotelin-1 antagonistleri ve fosfodiesteraz inhibitörleri gibi pulmoner vazodilatörlerin, akciğer dolaşımında gelişmiş vazokonstriksiyonu hedefleyerek PAH hastalığının ilerlemesini yavaşlatabileceği ve hastalarda belirgin şekilde iyileşme sağlayabileceği düşünülmektedir. Ancak bu tedavi yolları pulmoner yeniden şekillenmeyi veya hastalığın altında yatan nedenleri tedavi etmezler. Endotelial progenitör hücrelerin (EPC'lerin) ise vasküler hasar bölgelerine girerek ve kan damarlarını yenileyerek vasküler homeostazın korunmasında önemli bir role sahip olduğu

düşülmektedir [41]. EPC'ler, endotelial hücelere farklılaşabilen, hasarlı pulmoner kan damarlarını onarma ve yenileme yeteneğine sahip kemik iliği kaynaklı hücelerdir [42]. Kemik iliğinden harekete geçirilen ve akciğerlerde lokal olarak bulunan EPC'lerin PAH tedavisinde kullanımına duyulan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Dolaşımdaki EPC'lerin eksikliğinin PAH'ta pulmoner vasküler patolojisinde rol oynayabileceği ve EPC'lerin transfüzyonunun yeni hücre bazlı bir tedavi sunabileceği düşünülmektedir [43,44].

EPC'ler, doku iskemisine veya travmatik yaralanmaya yanıt olarak kemik iliğinden periferik kan içine mobilize edilip hasarlı endotel bölgelerine göç etmekte ve in situ olgun endotel hücelerine farklılaşmaktadır. Bu özellik sayesinde EPC'lerin gen iletimi için kullanılabilirliği düşünülmüştür. Nagaya ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, insan kordon kanından elde ettikleri EPC'lerini, vazodilatör etkiye sahip bir peptid olan andrenomedulinin (AM) akciğerlere iletimini sağlayarak PAH tedavisi için kullanmışlardır. AM cDNA'sı için non-viral vektör olarak biyolojik olarak bozunabilen jelatin mikroküreleri hazırlanmıştır. Jelatin mikroküreleri, jelatinin glutaraldehit ile çapraz bağlanmasıyla oluşturulmuştur. İnsan AM cDNA'sını kodlayan vektör oluşturulup, mikroküreler ile 4°C'de 24 saat inkübe edilerek DNA-jelatin kompleksleri elde edilmiştir. Oluşturulan bu kompleks EPC'lerin fagositoz yeteneği ile hücelerin içine yüklenmiştir. Normal EPC'ler ve AM DNA-jelatin kompleksi içeren EPC'ler monokrotalin ile indüklenmiş PAH'lu sıçanlara uygulanmış ve sonuçları karşılaştırılmıştır. AM ekspresyon eden EPC'lerin, pulmoner hipertansiyon ve vasküler yeniden şekillenmede tek başına EPC'ye göre önemli ölçüde daha fazla iyileşmeye neden olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, EPC'lerin fagositoz etkisine dayanan hibrit hücre-gen tedavisinin PAH'un tedavisi için yeni bir terapötik strateji olabileceğini düşündürmüştür [45].

miRNA

MicroRNA'lar (miRNA), gen ekspresyonu, proliferasyon, metabolizma ve hücre ölümü gibi çeşitli biyolojik işlemlere katılan, kodlayıcı olmayan 21-23 nükleotit uzunluğundaki RNA'lardır [46]. İlk miRNA'lar 1990'ların başında karakterize edilmişlerdir ve çok sayıda hastalık da dahil olmak üzere birçok biyolojik olayda yer aldıkları bulunmuştur. miRNA'lar, mRNA molekülleri içindeki tamamlayıcı dizilere bağlanarak işlev görür ve genellikle translasyonel baskılama veya hedef degradasyonu yoluyla gen susturulması ile sonuçlanır [47]. Moleküler düzeyde miRNA'ların iyon kanallarının ve mitokondriyal fonksiyonun kontrolünde ve ayrıca PAH'da akciğer bozukluğuna katkıda bulunan BMPR2 sinyal yolunun düzenlenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir [48]. miRNA ekspresyon anormallikleri, pulmoner arteriyel düz kas hücelerinin anormal çoğalmasına ve pulmoner arteriyel endotel hücelerinin işlev bozukluğuna neden olmaktadır [49]. Yapılan çalışmalarda; MiR-21'in hipoksiye bağlı pulmoner arteriyel düz kas hüceleri proliferasyonunu ve migrasyonunu etkilediği, MiR-17/92'nin ise PAH ile güçlü bir şekilde ilişkili olan kemik morfojenik reseptör Tip II'nin düzensiz ekspresyonuna neden olduğu bulunmuştur [46].

Mclendon ve arkadaşları yaptıkları çalışma ile microRNA-145 inhibitörlerinin PAH üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada non-viral vektör olarak lipozom kullanılmıştır. Lipozom formülasyonlarının hazırlanmasında lipit olarak bir lipopoliamin çekirdek yapısı olan staramin (Star) ve buna metoksipolietilen glikolün (mPEG) kovalent bağlanması ile modifiye edilmiş Star-mPEG kullanılmıştır. Star:Star-mPEG lipitleri kloroform içerisinde çözülmüş ve bir gece boyunca çözücü buharlaştırılarak film tabakası elde edilmiştir. Daha sonra film tabakası su ile hidrate edilip 30 dakika sonike edilmiştir. Hazırlanan lipozomlar ve antimiR-145 %5 dekstroz ile seyreltilmiş ve 0,2 mg/mL antimiR-145 konsantrasyonuna sahip bir formülasyon elde etmek için eşit hacimlerde karıştırılmıştır. Hazırlanan bu lipozom formülasyonları PAH oluşturulmuş sıçanlara intravenöz yol ile uygulanmıştır. Lipozomların vücuttaki dağılımı incelendiğinde, antimiR-145 seviyeleri akciğerlerde, sağ ve sol ventriküle oranla daha yüksek bulunmuştur. Akciğerlerde antimiR-145'in tutulması akciğerlerde bulunan endojen miR-145 seviyelerini önemli ölçüde düşürmüştür. Ayrıca kalp dokusunda bulunan miR-145 seviyelerinde de düşüş gözlenmiştir. Yapılan toksisite çalışmalarında da hepatik, kardiyak, metabolik veya hematolojik toksisite gözlenmemiştir. AntimiR-145 tedavisinin pulmoner damarlardaki kalınlaşmayı azalttığı görülmüştür. Elde edilen bu sonuç PAH'da oluşan yeniden şekillenmenin antimiR-145 tedavisi ile kısmen onarıldığını düşündürmüştür. AntimiR-145 lipozomlarının PAH'lı sıçanlarda sağ ventrikül hipertrofisinin kısmi onarımı ile sonuçlanan faydalı kardiyak etkilere sahip olduğu gözlenmiştir. Hazırlanan lipozom formülasyonlarının akciğerlere etkin madde taşınması, düşük toksisitesi ve iyi bir tedavi etkinliği sayesinde hastanın yaşam kalitesini ve sağ kalımını iyileştirmek, PAH'ın pulmoner arteriyopatisini ve sağ ventrikül hipertrofisini düzeltmek için miRNA tedavisinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır [50].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Genel olarak, PAH'da uygulanacak tedavi stratejisi hastanın klinik durumunun ağırlığına göre belirlenmektedir. PAH için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış tedavi stratejileri prostasiklin, endotelin ve nitrik oksit yolaklarını hedeflemektedir. Bu tedavi stratejileri hastaların yaşam kalitesini artırmakla birlikte, tedaviye karşı hasta uyuncunun düşük olması ve yan etkilerin görülmesi PAH'ı hastaların büyük bir kısmı için hayatı sınırlandıran bir hastalık haline getirmektedir. PAH'ın patofizyolojisi ile ilgili bilgilerin gün geçtikçe artması, tedavide rhoA/rho kinaz, tirozin kinaz, endotel progenitör hücreleri, vazoaktif bağırsak peptidi ve miRNA gibi yeni moleküler yolakların kullanımını gündeme getirmiştir. Ayrıca, tedavide kullanılmak üzere onaylanmış ve inceleme aşamasında olan etkin maddelerin etkinliğini artırmak için hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımı, optimum etkinin elde edilmesi ve yan etki görülme potansiyelinin azaltılması açısından umut verici olmuştur.

YAZAR KATKILARI

Kavram: C.Y., B.D.; Tasarım: B.D.; Denetim: B.D.; Kaynaklar: C.Y., B.D.; Malzemeler: C.Y., B.D.; Veri toplama ve/veya işleme: C.Y., B.D.; Analiz ve/veya yorumlama: C.Y., B.D.; Literatür taraması: C.Y.; Makalenin yazılması: C.Y., B.D.; Kritik inceleme: B.D.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Zolty, R. (2020). Pulmonary arterial hypertension specific therapy: The old and the new. *Pharmacology & Therapeutics*, 214(2020), 1-18.
2. Galie, N., Humbert, M., Vachiery, J., Gibbs, S., Lang, I., Torbicki, A., Simonneau, G., Peacock, A., Noordegraaf, A.V., Beghetti, M., Ghofrani, A., Sanchez, M.A.G., Hansmann, G., Klepetko, W., Lancellotti, P., Matucci, M., McDonagh, T., Pierard, L.A., Trindade P.T., Zompatori, M., Hoeper, M. (2016). Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *European Heart Journal*, 37, 67-119.
3. Türk Toraks Derneği Web site. Retrieved February 5, 2020. from <https://www.toraks.org.tr/halk/News.aspx?detail=2180>
4. Öztürk, Ö., Şahin, Ü. (2009). Pulmoner hipertansiyon: Tanı ve tedavisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 16 (1), 39-47.
5. Demir, R., Küçüköğlü, M.S. (2010). Pulmoner arter hipertansiyonunda egzersiz kapasitesinin değerlendirilmesi. *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi*, 38(8), 580-588.
6. Vaidya, B., Gupta, V. (2015). Novel therapeutic approaches for pulmonary arterial hypertension: Unique molecular targets to site-specific drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 211, 118-133.
7. Gunt, C., Çekmen, N. (2016). Pulmoner hipertansiyon ve weaning. *Türk Yoğun Bakım Dergisi*, 14, 68-79.
8. Spiekerkoetter, E., Kawut, S.M., de Jesus Perez, V.A. (2019). New and emerging therapies for pulmonary arterial hypertension. *Annual Review of Medical*, 70, 45-59.
9. Çörtük, M., Çetinkaya, E. (2017). Pulmoner arteriyel hipertansiyonda prostasiklin analogları ve prostaglandin reseptör agonistleri. *Türkiye Klinikleri Akciğer Arşivi*, 18(1), 17-24.
10. Kılıçkesmez, K., Küçüköğlü, M.S. (2010). Pulmoner arteriyel hipertansiyon tedavisinde fosfodiesteraz-5 inhibitörleri. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*, 10(2), 16-18.

11. Gessler, T. (2018). Inhalation of repurposed drugs to treat pulmonary hypertension. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 133, 34-44.
12. O'Connell, C., Amar, D., Boucly, A., Savale, L., Jais, X., Chaumais, M., Montani, D., Humbert, M., Simonneau, G., Sitbon, O. (2016). Comparative safety and tolerability of prostacyclins in pulmonary hypertension. *Drug Safety*, 39, 287-294.
13. Ishihara, T., Hayashi, E., Yamamoto S., Kobayashi, C., Tamura, Y., Sawazaki, R., Tamura, F., Tahara, K., Kasahara, T., Ishihara, T., Takenaga, M., Fukuda, K., Mizushima, T. (2015). Encapsulation of beraprost sodium in nanoparticles: Analysis of sustained release properties, targeting abilities and pharmacological activities in animal models of pulmonary arterial hypertension. *Journal of Controlled Release*, 197, 97-104.
14. Leifer, F.G., Konicek, D.M., Chen, K., Plaunt, A.J., Salvail, D., Laurent, C.E., Corboz, M.R., Li, Z., Chapman, R.W., Perkins, W.R., Malinin, V.S. (2018). Inhaled treprostinil-prodrug lipid nanoparticle formulations provide long-acting pulmonary vasodilation. *Drug Research*, 68 (11), 605-614.
15. Jain, P.P., Leber, R., Nagaraj, C., Leitinger, G., Lehofer, B., Olschewski, H., Olschewski, A., Prassl, R., Marsh, L.M. (2014). Liposomal nanoparticles encapsulating iloprost exhibit enhanced vasodilation in pulmonary arteries. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 3249-3261.
16. Alwan, R.M., Raja, N.A., Alhagiesia, A.W. (2020). Formulation and optimization of lyophilized selexipag nanocrystals to improve the saturation solubility and dissolution rate. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(11), 596-605.
17. Mirici, A., Gönlügür, U. (2011). Pulmoner hipertansiyonda medikal tedavi. *Nobel Medicus*, Cilt 7(1), 5-11.
18. Segura-Ibarra, V., Wu, S., Hassan, N., Moran-Guerrero, J.A., Ferrari, M., Guha, A., Karmouty-Quintana, H., Blanco, E. (2018). Nanotherapeutics for treatment of pulmonary arterial hypertension. *Frontiers in Physiology*, 9:890, 1-16.
19. Anjaneyulu, V., Gnanaprakash, K., Chandrasekhar, K.B. (2014). Development and evaluation of bosentan pulsincap formülasyon for controlled release. *International Journal of Pharmaceuticals and Health Care Research*, 2(2), 109-114.
20. Deshmane, S., Deshmena, S., Shelke, S., Biyani, K. (2018). Enhancement of solubility and bioavailability of ambrisentan by solid dispersion using *Daucus carota* as a drug carrier: formulation, characterization, in vitro, and in vivo study. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44(6), 1001-1011.
21. Hill, N.S., Preston, I.R., Roberts, K.E. (2015). Inhaled therapies for pulmonary hypertension. *Respiratory Care*, 60(6), 794-805.
22. Selimoğlu Şen, H. (2015). İdyopatik pulmoner arter hipertansiyonu tedavisi: Güncel durum ve gelecekteki yönelişler. *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi*, 3(1), 100-118.
23. Shahin, H.I., Vinjamuri, B.P., Mahmoud, A.A., Shamma, R.N., Mansour, S.M., Ammar, H.O., Ghorab M.M., Chougule, M.B., Chablani, L. (2019). Design and evaluation of novel inhalable sildenafil citrate spray-dried microparticles for pulmonary arterial hypertension. *Journal of Controlled Release*, 302, 126-139.

24. Lila, A.S.A., Gomaa, E., Ghazy, F.E.S., Hasan, A.A. (2020). Treatment of pulmonary arterial hypertension by vardenafil-solid dispersion lozenges as a potential alternative drug delivery system. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 55:101444, 1-7.
25. Rad, R.T., Dadashzadeh, S., Vatanara, A., Alavi, S., Ghasemian, E., Mortazavi, S.A. (2019). Tadalafil nanocomposites as a dry powder formulation for inhalation, a new strategy for pulmonary arterial hypertension treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 133, 275-286.
26. Başkurt, M., Küçüköğlü, M.S. (2010). Pulmoner arteriyel hipertansiyon tedavisinde prostanoidler. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*, 10(2), 2-8.
27. Galiè, N., Palazzini, M., Leci, E., Manes, A. (2010). Current therapeutic approaches to pulmonary arterial hypertension. *Revista Española de Cardiología*, 63(6), 708-24.
28. Hoepfer, M.M., Dinh-Xuan, A.T. (2004). Combination therapy for pulmonary arterial hypertension: Still more questions than answers. *European Respiratory Journal*, 24, 339-340.
29. Okutucu, S., Tokgözoğlu, L. (2010). Güncel kılavuzlar ışığında pulmoner hipertansiyonda tedavi algoritmaları. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*, 10(2), 19-26.
30. Huertas, A., Tu, L., Guignabert, C. (2017). New targets for pulmonary arterial hypertension: Going beyond the currently targeted three pathways. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 23(5), 377-385.
31. Duong-Quy, S., Bei, Y., Liu, Z., Dinh-Xuan, A.T. (2013). Role of rho-kinase and its inhibitors in pulmonary hypertension. *Pharmacology & Therapeutics*, 137, 352-364.
32. Pacaud, P., Loirand, G. (2010). Rho kinase inhibitors for pulmonary hypertension: Waiting for clinical evidence. *European Respiratory Journal*, 36, 709-711.
33. Barman, S.A., Zhu, S., White, R.E. (2009). RhoA/Rho-kinase signaling: A therapeutic target in pulmonary hypertension. *Vascular Health and Risk Management*, 5, 663-671.
34. Gupta, V., Gupta, N., Shaik, I.H., Mehvar, R., McMurtry, I.F., Oka, M., Nozik-Grayck E., Komatsu, M., Ahsan, F. (2013). Liposomal fasudil, a rho-kinase inhibitor, for prolonged pulmonary preferential vasodilation in pulmonary arterial hypertension. *Journal of Controlled Release*, 167(2), 189-199.
35. Godinas, L., Guignabert, C., Seferian, A., Perros, F., Bergot, E., Sibille Y., Humbert, M., Montani, D. (2013). Tyrosine kinase inhibitors in pulmonary arterial hypertension: A double-edge sword?. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 34, 714-724.
36. Alkhatib, Y., Albashaireh, D., Al-Aqtash, T., Awdish, R. (2016). The role of tyrosine kinase inhibitor “lapatinib” in pulmonary hypertension. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 37, 81-84.
37. Akagi, S., Nakamura, K., Miura, D., Saito, Y., Matsubara, H., Ogawa, A., Matoba, T., Egashira, K., Ito, H. (2015). Delivery of imatinib-incorporated nanoparticles into lungs suppresses the development of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *International Heart Journal*, 56, 354-359.

38. Petkov, V., Mosgoeller, W., Ziesche, R., Raderer, M., Stiebellehner, L., Vonbank, K., Funk, G., Hamilton, G., Novotny, C., Burian, B., Block, L. (2003). Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension. *The Journal of Clinical Investigation*, *111*, 1339-1346.
39. Leuchte, H.H., Baezner, C., Baumgartner, R.A., Bevec, D., Bacher, G., Neurohr, C., Behr, J. (2008). Inhalation of vasoactive intestinal peptide in pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*, *32*, 1289-1294.
40. Hajos, F., Stark, B., Hensler, S., Prassl, R., Mosgoeller, W. (2008). Inhalable liposomal formulation for vasoactive intestinal peptide. *International Journal of Pharmaceutics*, *357*, 286-294.
41. Chen, H., Strappe, P., Chen, S., Wang, L. (2014). Endothelial progenitor cells and pulmonary arterial hypertension. *Heart, Lung and Circulation*, *23*, 595-601.
42. Sun, H., Li, G., Du, Z., Bing, Z., Ji, Z., Luo, G., Pan, S. (2019). The relationship between endothelial progenitor cells and pulmonary arterial hypertension in children with congenital heart disease. *BMC Pediatrics*, *19*(1), 1-6.
43. Diller, G., Thum, T., Wilkins, M.R., Wharton, J. (2010). Endothelial progenitor cells in pulmonary arterial hypertension. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *20*, 22-29.
44. Fadini, G.P., Avogaro, A., Ferraccioli, G., Agostini, C. (2010). Endothelial progenitors in pulmonary hypertension: New pathophysiology and therapeutic implications. *European Respiratory Journal*, *35*, 418-425.
45. Nagaya, N., Kangawa, K., Kanda, M., Uematsu, M., Horio, T., Fukuyama, N., Hino, J., Harada-Shiba, M., Okumura, H., Tabata, Y., Mochizuki, N., Chiba, Y., Nishioka, K., Miyatake, K., Asahara, T., Hara, H., Mori, H. (2003). Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation*, *108*, 889-895.
46. Rothman, A., Restrepo, H., Sarukhanov, V., Evans, W.N., Wiencek, R.G., Williams, R., Hamburger, N., Anderson, K., Balsara, J., Mann, D. (2017). Assessment of microRNA and gene dysregulation in pulmonary hypertension by endoarterial biopsy. *Pulmonary Circulation*, *2017*, *7*(2), 455-464.
47. Sun, M., Yang, Q. (2013). Role of microRNAs in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Cardiovascular Pharmacology*, *3*(1), 1-3.
48. Santulli, G. (2015). *microRNA: Medical Evidence From Molecular Biology to Clinical Practice*. Volume 888, Springer International Publishing, Switzerland, p.237.
49. Miao, C., Chang, J., Zhang, G. (2018). Recent research progress of microRNAs in hypertension pathogenesis, with a focus on the roles of miRNAs in pulmonary arterial hypertension. *Molecular Biology Reports*, *45*, 2883-2896.
50. McLendon, J.M., Joshi, S.R., Sparks, J., Matar, M., Fewell, J.G., Abe, K., Oka, M., McMurtry, I.F., Gerthoffer, W.T. (2015). Lipid nanoparticle delivery of a microRNA-145 inhibitor improves experimental pulmonary hypertension. *Journal of Controlled Release*, *210*, 67-75.



İLAÇ KEŞFİ VE GELİŞTİRİLMESİNDE YAPAY ZEKÂ

ARTIFICIAL INTELLIGENCE ON DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT

İrem Nur ÇELİK* , Firdevs Kübra ARSLAN , Ramazan TUNÇ , İlkey YILDIZ* 

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

ÖZ

Amaç: Makine zekâsı olarak da bilinen Yapay Zekâ'nın ilaç keşfi ve geliştirilme sürecindeki yeri ve öneminin ortaya konması amaçlanmıştır.

Sonuç ve Tartışma: İlaç keşfi ve geliştirme aşamaları, insan sağlığına ve refahına katkıda bulunan en önemli çeviri bilim etkinlikleri arasındadır. Bununla birlikte, yeni bir ilacın geliştirilmesi oldukça karmaşık, pahalı ve oldukça uzun bir süreçtir. Maliyetlerin nasıl azaltılacağı ve yeni ilaç keşfinin nasıl hızlandırılacağı endüstride zorlu ve ivedi ile çözülmesi gereken bir soru haline gelmiştir. Yapay zekânın (AI) yeni deneysel teknolojilerle bir araya gelmesi, yeni ilaç arayışını daha hızlı, daha ucuz ve daha etkili hale getirmesi beklenmektedir. Bu derlemede, ilaç keşif sürecini hızlandırmak için ortaya çıkan yapay zekâ uygulamaları ele alınmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bilgisayar-destekli ilaç keşfi, makine öğrenmesi, yapay zekâ

ABSTRACT

Objective: It is aimed to reveal the place and importance of Artificial Intelligence, also known as machine intelligence, in drug discovery and development.

Result and Discussion: The drug discovery and development stages are among the most important science activities contributing to human health and well-being. However, the development of a new drug is a complex, expensive, and lengthy process. How to reduce costs and accelerate the discovery of new drugs has become a challenging and urgent question in the industry. The combination of artificial intelligence (AI) with new experimental technologies is expected to make the search for new drugs faster, cheaper and more effective. In this review, emerging artificial intelligence applications to speed up the drug discovery process are discussed.

Keywords: Computer-aided drug discovery, machine learning, artificial intelligence

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: İrem Nur Çelik
e-posta / e-mail: irmnur@hotmail.com, Tel. / Phone: +90538 889 54 48

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: İlkey Yıldız
e-posta / e-mail: iyildiz@pharmacy.ankara.edu.tr, Tel. / Phone: +905335705033

GİRİŞ

Hastalık biyolojisinin anlaşılmasındaki ilerlemelere ve teknolojiye etkileyici sıçramalara rağmen, pazara yeni ilaçlar getirmek, büyük ölçüde klinik çalışmalarda başarısızlıklarla ilişkili önemli maliyetler nedeniyle, zaman alıcı ve pahalı bir süreç olmaya devam etmektedir [1].

Küçük moleküllü ligandlardan klinik olarak kullanılabilen ilaçlara kadar ilaç keşif yolu uzun ve meşakkatli bir süreç olmuştur. Mekanistik olarak, ilaçların sadece hastalık hedeflerine yeterince bağlanma affinitesi göstermesi değil, aynı zamanda bu hedeflere erişimi mümkün kılmak için çoklu fizyolojik engellerden uygun taşınmayı da sağlaması gerekir. Genetik varyasyonun ilaç yanıtlarını etkilediği farmakogenetik ve istenmeyen proteinlerle hedef dışı etkileşimlerden kaynaklanan kimyasal toksisite gibi diğer sorunların hepsinin ilaç tasarımında dikkate alınması gerekir. Bu nedenle, ilaç keşfindeki bu çok yönlü sorunlar, genellikle ilaç tasarımcıları için önemli zorluklar ortaya çıkarmıştır [2].

Pazara daha düşük maliyetle daha fazla hastaya ilaç sağlamak için yeni fikirlere, yeni ve gözden geçirilmiş ilaç keşif sürecine ilişkin kavramlara ve yenilikçi yaklaşımlara ihtiyaç vardır. Bu bağlamda, bilgisayar destekli küçük moleküllü ilaç tasarımı uzun zamandır potansiyel bir fırsat olarak görülmüştür [1]. Son zamanlardaki yapay zekâ yaklaşımının yükselişi, bu zorluklara potansiyel çözümler olarak görülmektedir [2].

Yapay Zekâ Tanımı ve Tarihçesi

Yapay zekâ (Artificial Intelligent (AI)), insan zekâsı sürecinin bilgisayarlar tarafından simülasyonudur. Süreç, bilgi edinmeyi, bilgiyi kullanmak için kurallar geliştirmeyi, yaklaşık veya kesin sonuçlara varmayı ve kendi kendini düzeltmeyi içerir. Yapay zekâ, bilgisayarların insan davranışını taklit etmesini sağlayan tekniklerin kullanımı olarak tanımlanmaktadır [3].

Yapay zekâ tabanlı algoritmalar, tahmin edilecek moleküler özellikleri belirleyen fiziksel yasaların tam olarak bilinmediği veya deneysel ilişkilerin kurulamayacak kadar karmaşık olduğu sorunlar için özellikle çok uygundur [4]. Birçok alanda yapay zekâ tabanlı yaklaşımlardan yararlanılmaktadır. Bu alanlardan biri de ilaç geliştirmedir.

"Yapay zekâ" kavramı, John McCarthy tarafından 1956'daki Dartmouth Konferansında "akıllı makineler yapma bilimi ve mühendisliğini" tanımlamak için üretilmiştir [5]. McCarthy'nin bu tanımı, günümüzde hala geçerlidir. Multidisipliner bir alan olan AI, bilgisayar bilimi, matematik, psikoloji, dilbilim, felsefe, nöro-bilim, yapay psikoloji ve diğerleri gibi çeşitli disiplinlerden gelen görüşleri entegre eder. Son entelektüel ve mühendislik gelişmeler, yaşantımızın çeşitli yönlerinde problemleri çözen akıllı sistemlerin uygulanmasına doğru tamamen teorik çalışmalardan bu alanın ilerlemesine yardımcı olmaktadır. Bu tür uygulamaların kapsamında doğal dil anlama ve işleme, konuşma anlama ve işleme, mekanik / bilgisayar vizyon, otonomik / akıllı robotlar ve alan uzmanlığı edinme gibi farklı

alanlar ve çalışmalar bulunmaktadır [6]. AI tarafından ortaya çıkan geniş çaplı sorunlara rağmen, her durumda bilgi edinme ve sürdürmeyi içeren, bilgi temsili, çözüm arama, mantık muhakemesi ve makine öğrenmesi gibi büyük rol oynayan bazı temel yöntemler vardır [7, 8].

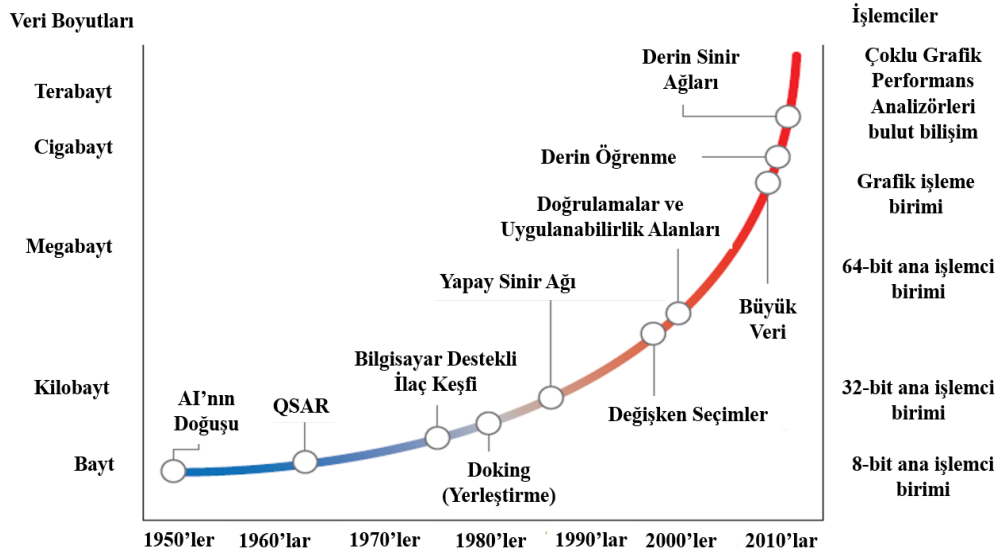
1930'ların ortalarında Alan Turing, günümüzde "evrensel Turing makinesi" olarak adlandırılan ve olası herhangi bir bilgisayarı simüle edebilen bir fikri ortaya atmıştır. Yapay zekânın tarihi gelişiminde canlanma ve çöküş gibi düzensiz bir ilerleme olmuştur [6]. 1950'ler ve 1960'lar bu konuda altın çağın erken dönemlerini oluşturmuştur. Bu dönemlerde hüristik araştırmalar, mantıksal akıl yürütme kavramları ve uygulanabilir insan-makine etkileşim için sembolik yöntemler ortaya konmuştur. 1964'te bazı matematiksel teoremlerin ve ifadelerin mantıksal çıkarımlarının makine kanıtlarını ortaya koyabilen STUDENT adlı bir makine ön zekâyâ sahip ilk makine olarak tasarlanmıştır [9]. 1966 yılında ise sınırlı bir biçimde de olsa insan diyalogunu taklit edebilen ELIZA adlı bir makine keşfedilmiştir [10]. Yapay zekâ, 1980'lerin başında ikinci zirvesine ulaşmıştır. Yapay zekâ ile ilgili matematiksel modellerde, çok katmanlı ileri beslemeli sinir ağı ve geri yayılım algoritması dahil olmak üzere önemli ilerleme kaydetmiştir [11, 12]. Bu araçlar, evrenin soyut bir modelinin oluşturulmasına ve veri girişi yapılmış modelin (geri bildirimden öğrenme) güncellenmesine olanak sağlar. Bu tür yöntemlerin kimya ve moleküler biyoloji alanına ilk girişi, protein sekans bilgisinden ikincil yapının tahmin edilmesiyle sağlanmıştır [13].

1950'lerde doğan Yapay Zekâ kavramı sonraki süreçlerde ilaç keşfinde de kullanılmıştır. Yapay zekânın özellikle yapı-aktivite ilişkilerinin modellenmesinde kullanımının ilaç keşfine uygulanması tahmin edilenden daha eskiye dayanmaktadır. Örneğin, deneysel değerleri alma ve regresyon için bir "descriptor (tanımlayıcı) set" kullanma fikri, Hammett'in [14] benzen türevlerinin reaksiyonları için reaksiyon hızlarını ve denge sabitlerini bağlayan öncü formülüne (ve muhtemelen daha da öncesine) ve bilgisayar destekli tanımlamaya ve ilaç endüstrisinde "Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri (Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR))'nin babası" olarak kabul edilen Hansch'ın biyoaktif moleküllerin fizikokimyasal özelliklerinin kantitatif olarak tanımlanması ve ölçülmesine kadar gider [15,16]. Kimyasalların biyolojik etkilerinin tahmin edilebilmesi ve değerlendirilmesi amacıyla o zamanlardan beri artan sayıda medisinal kimyacılar çeşitli AI yöntemlerini uygulamışlardır [17,18,6]. Dolayısıyla, AI, 1960'larda sunulan ilk Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri çalışmasından sonra ilaç keşfinde kullanılmıştır [15]. Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri yaklaşımlarına dayalı olanlar gibi mevcut hesaplama modelleri, çeşitli istenen farmakolojik aktiviteler için hızlı bir şekilde çok sayıda yeni etkili bileşiğin tahmin edilmesinde kullanılmaktadır. Mevcut modeller (örn., İlaç keşif için kullanılan ticari yazılımlar) basit fizikokimyasal özelliklere (örn., LogP, çözünürlük vb.) ait tahminler de yapabilmekte ve böylece basit mekanizmalarla yeni bileşiklerin farmakokinetik özellikleri hakkında kesin olmamakla birlikte nispeten yakın tahminler ortaya konmaktadır. Ancak karmaşık biyolojik özellikler için modeller (ilaç etkinliği ve yan etkiler) optimum olmaktan hala uzaktır. İlaç keşfinin erken aşamasında (1990'lardan

önce) model geliştirmek için kullanılan yaygın hesaplama yaklaşımları doğrusal regresyonlardı [19]. Bu ilk çalışmalarda, modelleme için kullanılan kimyasal tanımlayıcılar, atom tipi ve fragman tanımlayıcıları gibi kimyasal yapı özellikleri ile de sınırlıydı. Bu yaklaşımlar, yüksek veri boyutluluğuna duyarlı ve sınırlı derecede yorumlanabilecek korelasyon özelliği içerirlerdi. Modern regresyon-temelli yaklaşımlar ise bu sorunları giderecek teknikleri içermektedirler [20]. Örnek olarak, k-En Yakın Komşu (k-Nearest Neighbor (k-NN)), Destek Vektör Makineleri (Support Vector Machine (SVM)) ve Rastgele Orman (Random Forest (RF)) gibi doğrusal olmayan modelleme algoritmalarına dayalı olarak geliştirilen yeni makine öğrenmesi yaklaşımları sıklıkla kullanılmaktadır [21].

1990'lardan bu yana kombinatoryal kimyadaki büyük ilerlemelerle, büyük kimyasal kütüphaneler yeni kimyasal geliştirme prosedürlerinin ana kaynağı haline gelmiştir. Son on yılda, bu çaba aynı zamanda yüksek verimli tarama (High-throughput screening (HTS)) tekniklerinin geliştirilmesini de teşvik etmiştir [22].

Büyük verileri kullanmanın zorlukları ve yeni veri türlerinin (örn., Görüntüler) dahil edilmesi, modern ilaç keşfinde öngörücü modellemeyi ilerletmek için yeni AI yaklaşımlarının yakın zamanda geliştirilmesini gerektirmiştir. Mevcut büyük veri çağındaki popüler AI yaklaşımları derin öğrenmeye dayanmaktadır. Şekil 1'de gösterildiği gibi geçmişten günümüze artan veri boyutu ve bilgisayarın gücüyle yapay zekânın gelişimi şematize edilmektedir [21].



Şekil 1. Artan veri boyutu ve bilgisayar gücüyle ilaç keşfinde yapay zekânın tarihsel gelişimi [21].

Yapay Zekâ'nın Alt Grupları

Yapay zekâ teknolojileri, verilerden kavramları ve ilişkileri çıkarır ve veri modellerinden bağımsız olarak öğrenerek insanların neler yapabileceğini araştırır. Bu teknolojiler arasında bilgisayarla

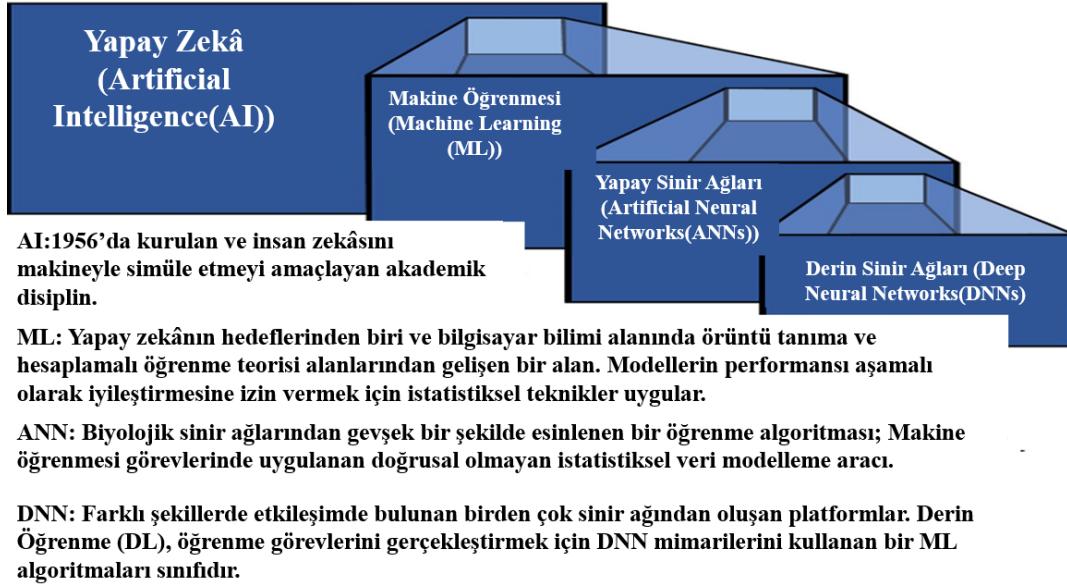
görme, derin öğrenme, makine öğrenmesi, doğal dil işleme, robotik, konuşma, denetimli öğrenme ve denetimsiz öğrenme gibi uygulamalar bulunur [23]:

Makine Öğrenmesi (Machine Learning (ML)): Yapılandırılmış ve yapılandırılmamış verilerden öğrenen, gizli kalıpları belirleyen, sınıflandırmalar yapan ve gelecekteki sonuçları tahmin eden bilgisayar algoritmalarıdır.

Derin Öğrenme (Deep Learning (DL)): Konuşma, görüntü ve video gibi kalıpları tanımak ve ayırt etmek için sinir ağları adı verilen beyne benzer bir mantık yapısını kullanan makine öğrenmesi tabanlı bir yaklaşımdır.

Doğal Dil İşleme (Natural Language Processing (NLP)): Hesaplama tekniklerinin doğal dil ve konuşmanın analiz ve sentezine uygulanmasıdır [23].

AI'nın hedeflerinden biri model performansının aşamalı olarak iyileştirilmesine izin veren ML platformlarının oluşturulmasıdır. Örneğin, sinir ağlarının karmaşık mimarilerine dayanan yeni bir makine öğrenmesi algoritmaları sınıfı olan derin DL, mevcut modelleri iyileştirmek veya yeni hesaplama platformları geliştirmek için olası bir araç olarak Şekil 2'de de gösterildiği gibi öne çıkmaktadır. Bu bakış açısı, derin öğrenme dahil olmak üzere yeni makine öğrenmesi yöntemlerinin ilaç keşif sürecinin farklı alanlarında nasıl uygulandığını gösteren örneklere genel bir bakış sunmaktadır [24].



Şekil 2. Yapay Zekâ ve Derin Öğrenme Arasındaki Temel Tanımlar ve İlişkiler [23].

Genel olarak anlaşılması gereken dört farklı makine öğrenmesi türü bulunmaktadır.

Denetimli öğrenme (Supervised learning), bir modelin belirli bir sonucu tahmin etmek için etiketli veri kümeleri kullanılarak eğitilmesidir ve görev odaklıdır [25]. Bunun bir örneği, kantitatif yapı-aktivite

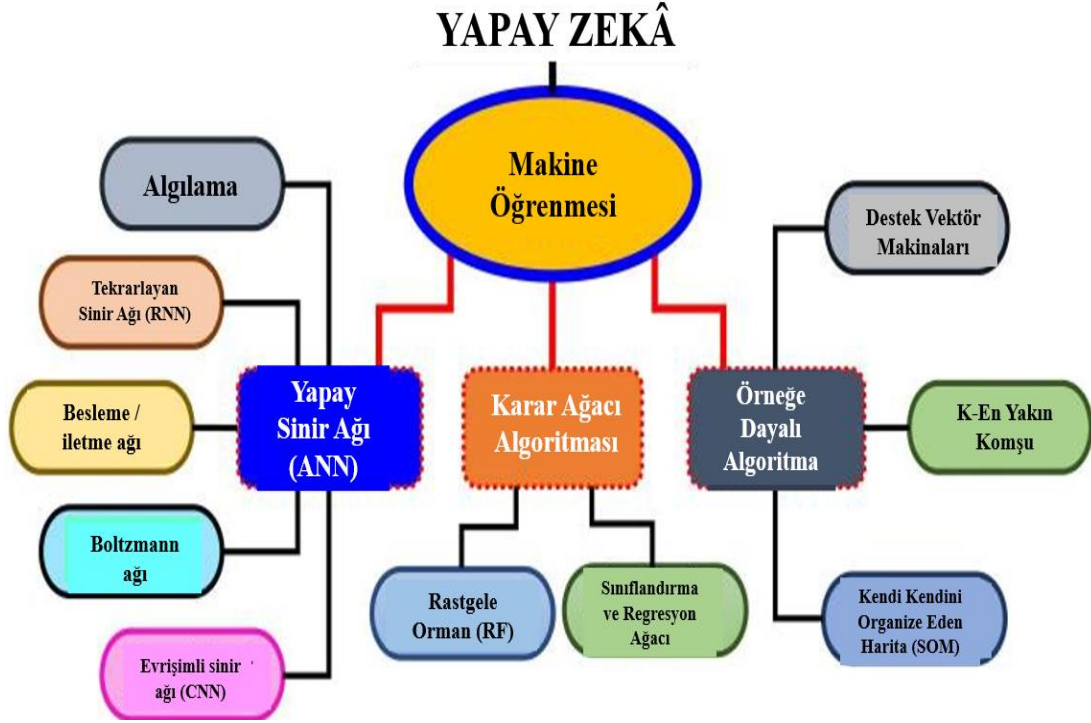
ilişkisi yaklaşımıdır. Bir kimyasalın çözünürlük ve biyoaktivite gibi özelliklerini tahmin etmek için kullanılır [26]. Denetimli öğrenmede yapay sinir ağına hem girdi hem de çıktı değerleri sunulur. Ağın ürettiği çıktı ile istenen çıktı arasındaki fark sıfır ya da sıfıra yakın bir değere ulaşmaya kadar ağırlıklar değiştirilir. Algoritma kabul edilebilir doğruluğa geldiğinde (veya daha fazla ilerleme kaydedilmediğinde) ya da eğitim veri kümesi tükendiğinde bunlardan hangisi önce gelirse yineleme sonlandırılır [27]. Bu öğrenme modelini kullanan ağlara Takviyeli Öğrenme (Reinforcement Learning (RL)), Perceptron ve İlişkili Hafızalar, Delta ve Genelleştirilmiş Delta Kuralı, Vektör Nicelik Öğrenmesi, Geri Yayılma Algoritması (Back-propagation algorithm), Stokastik Öğrenme (Stochastic Learning), Karar Ağaçları (Decision Trees), RF, SVM, Doğrusal ve Lojistik Regresyon (Linear and Logistic Regression), Naive Bayes Sınıflandırıcısı (Naive Bayes Classifier), Doğrusal Ayrımcılık Analizi (Linear Discriminant Analysis), k-NN algoritmaları ve Sinir Ağları (Neural Networks (NNs)) örnekleri verilebilir [28]. Denetimli makine öğrenmesinde iki tür vardır: Sınıflandırma ve Regresyon. Tahmin edilen çıktının sınırlı bir değerler kümesi olduğu gibi, sorun kategorik olduğunda sınıflandırma modelleri kullanılır. Regresyon modelleri, sorun bir aralık içindeki sayısal bir değeri tahmin etmeyi içerdiğinde kullanılır. Rastgele Orman, Otomatik Kodlayıcılar (AutoEncoder (AE)) ve Evrişimli Sinir Ağları (CNN) gibi çeşitli farklı türde makine öğrenmesi modelleri bu kategorideki uygulamalara örnektir [26].

Denetimsiz öğrenme (unsupervised learning), verilerle ilişki bulmak için etiketli verilerle eğitime bağlı değildir. Veri odaklı olup, gizli yapıları bulmak için verilerdeki kalıpları öğrenmeyi amaçlar [25]. Denetimsiz öğrenmede, ağa sadece girdi vektörü uygulanır. Girdi değerlerine uygun bir çıktı üretilinceye kadar bağlantı ağırlıkları değiştirilir. Bu metot görüntü işleme, işaret işleme, kontrol problemlerinde etkin olarak kullanılır [28]. Bunlardan en yaygın olanları şunlardır: Hiyerarşik Kümeleme (Hierarchical Clustering), K-Ortalama Kümeleme (k-Means Clustering), Gaussian Karışım Modelleri (Gaussian Mixture Modeling (GMM)), Kendi Kendini Düzenleyen Haritalar (The Self-Organizing Map (SOM)) ve Gizli Markov Modelleri (Hidden Markov Model (HMM)) [27].

Yarı denetimli öğrenme (Semi-supervised learning), daha küçük bir etiketlenmiş veri kümesi, birkaç veriden bir modelin tahmin edilmesi gereken ve daha az maliyetli olan daha büyük bir etiketlenmemiş veri kümesinin içindedir. Eğitim için etiketli veri noktalarını kullanır ve etiketli verilerden gelen bilgileri kullanarak bilinmeyen örneklerin etiketlerini tahmin etmeyi amaçlar [25, 29]. *Güçlendirilmiş öğrenme (Reinforced learning)*, sürekli öğrenen ve çevre ile etkileşimi olan ve belirli bir veri setini kullanmayı amaçlayan bir sistemdir.

Yarı denetimli öğrenmede, denetimli öğrenmeye benzer algoritmalar kullanılmıştır. Güçlendirilmiş öğrenme için kullanılan algoritmalara Q-Öğrenme (Q-Learning) ve Derin Öğrenme ağları örnek olarak verilebilir [29].

İlaç keşfi ve geliştirilmesi çalışmalarında uygulanabilecek yapay zekânın belli alt alanları Şekil 3'de topluca gösterilmiştir [30].



Şekil 3. Yapay Zekânın Yöntem Alanları [30].

Makine öğrenmesinin kapsadığı alt dallardan Derin Öğrenme, veri temsillerini öğrenmek için birçok doğrusal olmayan işlem birimi katmanıyla yapay sinir ağları (Artificial Neural Networks (ANN)) kullanan bir makine öğrenmesi algoritmaları sınıfıdır. İnsan merkezi sinir sistemini taklit etmek için bağlı yapay nöronlardan oluşan, yapay sinir ağı adı verilen geleneksel bir makine öğrenmesi algoritmasının yeniden markalandırılmasıdır [31, 32].

Derin Sinir Ağları (Deep Neural Networks (DNN)), birden çok gizli katmana sahip tamamen birbirine bağlı sinir ağlarıdır. Her gizli katman, birden fazla doğrusal olmayan işlem birimini içerir. DNN'ler, birçok farklı katmanda birden çok nöron kullanarak hiyerarşik düzeylerdeki özellikleri otomatik olarak çıkarır [25].

2014 yılından bu yana DNN'ler görüntü, ses ve metin tanıma, otonom sürüş ve diğer birçok işte insan doğruluğunu aşmıştır [33]. 2014 ve 2015 yıllarında derin öğrenmedeki ilerlemelere ilişkin ilaç endüstrisine yapılan erken sunumlar şüphecilikle sonuçlanmış ve reddedilmiştir. Fakat 2017'de birçok ilaç şirketi, yapay zekâ girişimleri için akademisyenlerle ortaklık kurmaya veya yerli Ar-Ge programları başlatmıştır. DNN'lerin küçük moleküllerin farmakolojik özelliklerini ve biyobelirteç gelişimini tahmin

etmek için transkripsiyonel yanıt verileri üzerine eğitiminden, yeni kimyanın üretilmesine kadar, derin öğrenme teknikleri biyomedikal araştırmanın birçok alanına hızla yayılmıştır.

Geleneksel makine öğrenmesi yöntemleri, manuel olarak tasarlanmış özellikleri kullanırken, derin öğrenme yöntemleri, özellikleri giriş verilerinden otomatik olarak öğrenebilir ve bu da çok katmanlı özellik çıkarma yoluyla basit özellikleri karmaşık özelliklere dönüştürebilir. Ayrıca, derin öğrenme yöntemlerinde geleneksel makine öğrenmesi yöntemlerine göre daha az genelleme hatası vardır. Bu da daha tatmin edici sonuçlar alınmasına yardımcı olur. Derin öğrenme yöntemleri esas olarak derin sinir ağlarından oluşur. Evrişimli sinir ağı, tekrarlayan sinir ağı (Recurrent Neural Networks (RNNs)), Otomatik Kodlayıcı, Kısıtlı Boltzmann Makinesi (Recurrent Boltzmann Machines (RBN)) gibi kısımlar bu sinir ağlarının parçalarıdır.

CNN, derin öğrenmedeki en temsili mimarilerden biridir. Görüntü ve ses tanımanın yanı sıra doğal dil işleme gibi birçok alanda yaygın olarak benimsenmiştir. Genellikle görüntü tanıma ve nesne sınıflandırması için kullanılan ileri beslemeli bir sinir ağıdır. Çok boyutlu diziler biçiminde olan verileri işlemek için oluşturulmuş veya geliştirilmiştir. Bu nedenle CNN, çoğunlukla gen ekspresyon veri analizinde kullanılır [34]. Geleneksel ilaç keşfinde, CNN'ler, HTS sonuçları gibi deneysel ilaç testlerinden elde edilen görüntü verilerini analiz etmek için de uygulanmıştır. Görüntü tanımadaki benzersiz avantajları nedeniyle, CNN'ler ligand-protein etkileşimlerini tahmin etmek için ve 3-boyutlu görüntüleri için de kullanılmıştır [21]. Adları evrişimsel katmanlardan gelir. Modern CNN, 1980'lerde Fukushima tarafından, Hubel ve Wiesel'in bir kedinin görsel korteksindeki alıcı alan (receptive field) araştırmalarından esinlenen Neocognitron'un geliştirilmesinden gelmiştir [35,36]. Görsel sinyalleri işlerken, yerel nöron kalıpları duyuşal boşluktaki belirli bölgeleri algılama sorumluluğunu üstlenir ve CNN, evrişimli katmanlarda iki ana karakter geliştirerek özelliklerini taklit eder: Seyrek Bağlanabilirlik ve Paylaşılan Ağırlıklar [32].

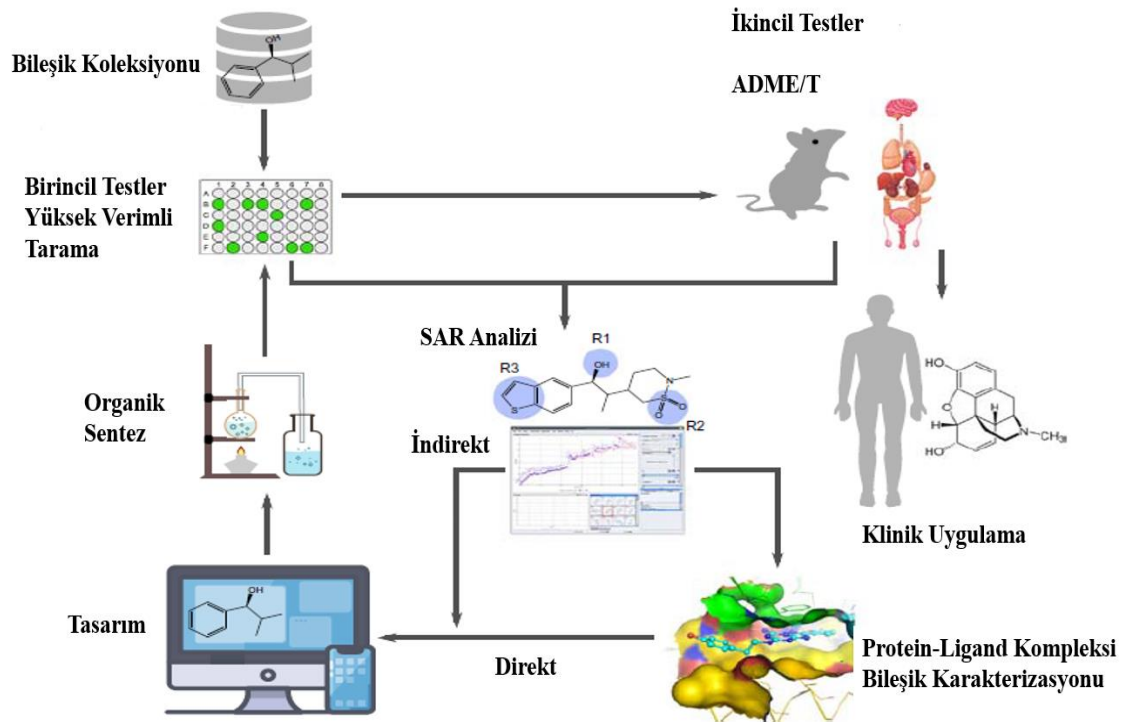
RNNs, derin öğrenmedeki diğer bir temsili türüdür. ANN'lerin "zaman serisi versiyonu" dur. Özellikle sekans verilerini işlemeyi amaçlayan RNN, NLP'de yaygın olarak kullanılmış ve büyük başarılar elde edilmiştir. Tahmin modellerinin ve dil modellerinin temelini oluştururlar. RNN, bir katmanın çıktısını kaydetme ve katmanın çıktısını tahmin etmek için girişi geri besleme prensibiyle çalışır [32]. Tekrarlayan sinir ağlarında ileri beslemeli ağların aksine, bir geri bildirim döngüsü vardır [37].

Son zamanlarda, AI teknolojileri, özellikle derin öğrenme modelleri, güçlü genelleme ve özellik çıkarma kabiliyetleri nedeniyle ilaç tasarımında büyük umutlar vaat etmektedir.

İlaç Keşfi ve Geliştirme Sürecinde Yapay Zekâ

İlaç keşif süreci, halihazırda mevcut literatürü okumaktan ve analiz etmekten potansiyel ilaçların hedeflerle etkileşim yollarını test etmeye kadar uzanır. İlaç keşfinin klinik öncesi geliştirme aşaması, hayvan modellerinde potansiyel ilaç hedeflerinin test edilmesini içerir. Bu aşamada yapay zekânın

kullanılması, denemelerin sorunsuz çalışmasına yardımcı olabilir. Araştırmacıların bir ilacın hayvan modeliyle nasıl etkileşime girebileceğini daha hızlı ve başarılı bir şekilde tahmin etmesini sağlayabilir. Araştırmacılar, prelinik geliştirme aşamasından geçtikten ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (The United States Food and Drug Administration (FDA or USFDA))' dan onay aldıktan sonra, ilacı insan katılımcılarla test etmeye başlar. Genel olarak, bu dört aşamalı bir süreçtir ve genellikle üretim yolculuğunun en uzun ve en pahalı aşaması olarak kabul edilir [38]. Şekil 4'de temsili bir ilaç keşif basamağı şematize edilmektedir.

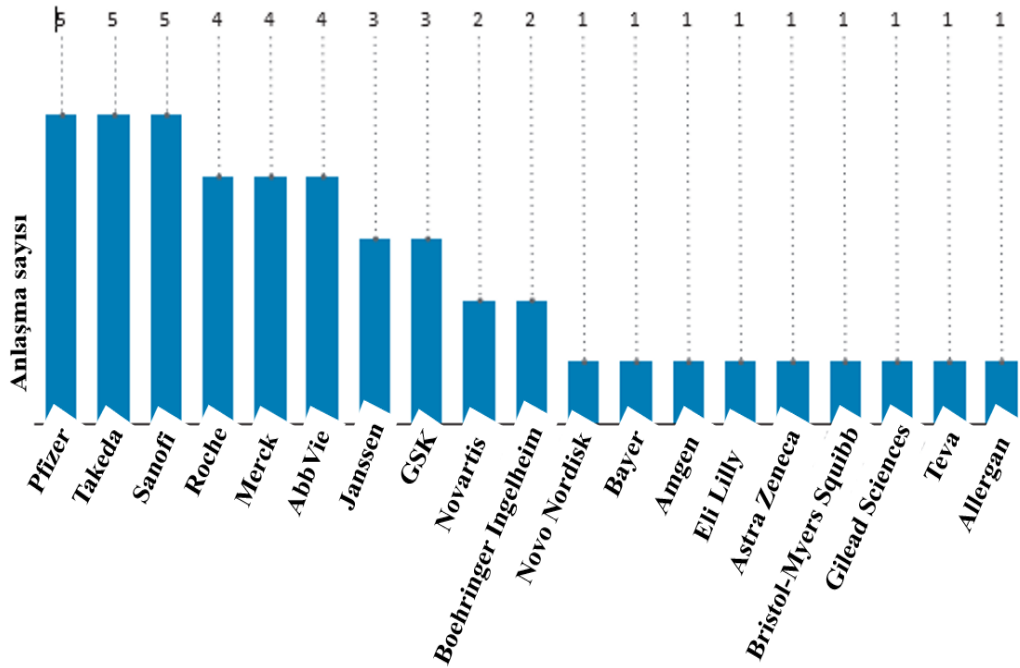


Şekil 4. Temsili bir ilaç keşif basamakları [39].

Insider Intelligence'ın İlaç Keşfi ve Geliştirmede yapay zekâ raporuna göre, AI şirketler için ilaç keşif maliyetlerini %70'e varan oranda azaltabilir [38]. İlaç firmalarının yapay zekâ odaklı ilaç çalışmaları Şekil 5'de grafik halinde listelenmektedir.

İlaç geliştirme sürecinde önemli fırsatlar sunan AI'nın kullandığı alanlarla ilgili bazı çalışmalara kısaca göz atacak olursak öncelikle küçük molekül taşıyan ilaç tasarımındaki uygulamasından bahsetmek gerekir. AI'nın altında yer alan DL modelleri, hesaplamalı kimyada üç ana alanda rapor edilmiştir Bunlar: yeni moleküller oluşturmak, ilaç-hedef etkileşimlerini (drug-target interactions (DTIs)) tahmin etmek ve translasyonel araştırmalar için emilim, dağıtım, metabolizma, atılım ve toksisite (ADME/T) özelliklerini tahmin etmek [40]. Diğer ML algoritmaları gibi, DL'de QSAR / QSPR

(Quantitative Structure-Properties Relationship) modellerini oluşturmada giderek daha başarılı uygulamalara doğru ilerlemektedir. Bunlarla ilgili bazı uygulamalar Tablo 1’de verilmiştir. 2012’nin başlarında Hilton grubu, kimyasal bileşik aktivitesi ve özellikleri tahmini için geliştirdikleri DL yöntemi ile Merck Kaggle yarışmasını [41] kazanmışlardır.



Şekil 5. Pazarda Açıklanan Yapay Zekâ Odaklı Büyük Biyo-İlaç Anlaşmaları [38].

İlaç keşfinde AI için en önemli fırsat, ilaçların yeniden konumlandırılarak kullanılmasıdır. Donner ve arkadaşları gen ekspresyon veri temelli bileşik fonksiyonel benzerliğini ölçmek için yeni bir metod bildirmişlerdir. Bu yaklaşım, DNN’nin avantajlarını kullanarak bir moleküldeki fonksiyonlu grubun yapısını taşıyan en yakın benzerlerini taşıyan bileşikleri bütünlüğü bozan verinin en aza indirgenmesiyle bulabilmektedir. Bu yöntemin bileşikler yapısal olarak farklı olduğunda bile paylaşılan terapötik ve biyolojik hedeflere sahip ilaçları belirleyebildiği ve böylece bileşikler arasında daha önce bildirilmemiş fonksiyonel ilişkileri ortaya çıkarabildiği bildirilmiştir. Bahsi geçen bu yaklaşım DeepCodex çevrimiçi olarak kullanıma sunulmuştur [42]. Bu ölçüm, yapısal olarak farklı olmasına rağmen biyolojik hedefleri paylaşan bileşiklerin tanımlanmasına izin vererek, bileşikler arasında önceden bilinmeyen fonksiyonel ilişkileri ortaya çıkarmıştır [43].

Xie ve arkadaşları, Entegre Ağ Tabanlı Hücresel İmzalar Kitaplığı (Library of Integrated Network-based Cellular Signatures (LINCS))’nın L1000 veritabanındaki transkriptom verilerini kullanarak ilaç-hedef etkileşimlerini öngörmek için bir DL metodu çalışması gerçekleştirmişler ve

modelin doğruluğunun %98 oranında olduğunu bildirmişlerdir [44]. Önceki verilerin derin öğrenme yaklaşımlarıyla yeniden kullanılması, ilaçların yeniden kullanılması için önemlidir [45].

Tablo 1. Küçük moleküllü ilaç keşfinde DL'nin temsili uygulamalarının özeti [32].

Metod	Öngördüğü	Veri seti	Özellikler
RNN	Bileşimin sudaki çözünürlüğü	1144, 1026, 74, 125 genişliğinde çoklu veri seti	Moleküler grafik
DNN	İlaç-hedef etkileşimi	2710 ligand ve 836 hedef	Moleküler tanımlayıcılar ve protein özellikleri
DNN	İlaç-hedef etkileşimi	MATADOR veri kümesi ve STITCH veri kümesi	Moleküler tanımlayıcılar
DNN	Geçirgenlik	663 + 209 kimyasal bileşik	Moleküler tanımlayıcılar
DNN	Toksosite	Tox21 veri kümesi	Moleküler parmak izleri ve tanımlayıcılar
RNN	Bileşimin proteinle etkileşimi	ChEMBL veritabanı; BindingDB	Moleküler parmak izleri ve protein dizisi
CNN	Biyolojik aktivitesi	ChEMBL veritabanı, DUDE veri kümesi	Moleküler grafik (AtomNet)
CNN	Sanal gösterimi	DUDE veri kümesi	Moleküler grafik ve doking (yerleştirme) sonucu
AE	Sanal gösterimi	6252	Parmak izleri
CNN	Biyolojik aktivite/toksisitesi	41,193/8014	2D kimyasal yapı görüntüsü
RNN	Biyolojik aktivitesi	756	SMILES
DNN	Biyolojik aktivitesi	ChEMBL veritabanı	Moleküler tanımlayıcılar ve parmak izleri
RNN	Odaklanmış moleküler kitaplıklar oluşturma	ChEMBL veritabanı	SMILES
RNN	Yeni moleküller üretmek	ChEMBL veritabanı	SMILES
Gan	Yeni moleküller üretmek	Birden çok veri kümesi	SMILES
CNN	Kohn-Sham kinetik enerjisi	3D elektron yoğunluğu	Parmak izleri

Gan: Çekişmeli Üretken Ağ

LINCS Programı Kütüphanesi, gen ekspresyonundaki değişiklikleri ve hücreler çeşitli rahatsız edici maddelere maruz kaldığında meydana gelen diğer hücresel süreçleri kataloglayarak, ağ tabanlı bir biyolojik anlayışı oluşturmayı amaçlamaktadır [46]. Metformin ve rapamisin, FDA onaylı rapamisinin mekanistik hedef (mechanistic target of rapamycin (mTOR)) inhibitörleridir ve mevcut klinik

uygulamalarının ötesinde önemli anti-kanser ve yaşlanma önleyici özellikler sergilerler. Bununla birlikte, her biri, advers etkiler nedeniyle etiket dışı, profilaktik kullanım için onay gerektiren sorunlarla karşı karşıyadır. Bu nedenle, metformin ve rapamisinin yaşlanmayı geciktirici etkilerini advers etkiler olmaksızın taklit eden nutrasötikleri (daha güvenli, doğal olarak oluşan bileşikler) belirlemek için bir çalışma başlatılmıştır. Metformin ve rapamisinin gen ve yol düzeyinde imzalarını haritalamak ve 800'den fazla doğal bileşik arasındaki eşleşmeleri taramak için LINCS veri kümesine çeşitli biyoinformatik yaklaşımlar ve derin öğrenme yöntemleri uygulanmıştır. Daha sonra, derin sinir ağı sınıflandırıcılarından oluşan bir toplulukla her bileşiğin güvenliğini tahmin edilmiştir. Analiz, allantoin ve ginsenosid (metformin), epigallokateşin gallat ve izoliquiritigenin (rapamisin) ve withaferin A (her ikisi) dahil olmak üzere birçok yeni aday metformin ve rapamisin mimetiklerini ortaya çıkarmıştır. Keşfedilmemiş bu dört bileşik de rapamisin ile benzer skorda bulunmuştur [46].

Bir ilaç adayı molekülün etki mekanizmasını ve *in vivo* güvenliğini öngörebilen bir yapay zekâ platformu, boşa harcanan zamanı ve maliyeti önemli ölçüde azaltabilmektedir [26]. Bu amaçla birkaç şirket örneği verilebilir. Bunlar DeepTox ve ProCTOR dur [47, 48]. Bunların her ikisi de yeni bileşiklerin toksisitesini öngörmeyi amaçlamaktadır. Bu AI platformlarının performansının, bileşiklerin toksisitesine ilişkin daha büyük ve sağlam veri kümeleri kullanılabilir hale getirildikçe artması beklenmektedir

Zhavoronkov ve arkadaşları, *de novo* küçük molekül tasarımı için üretken tensorial pekiştirmeli öğrenme (generative tensorial reinforcement learning (GENTRL)) adında bir DL modeli geliştirmişlerdir [49]. GENTRL, sentetik fizibiliteyi, yeniliği ve biyolojik aktiviteyi optimize etmektedir. Araştırmacılar, GENTRL'i kullanarak 21 gün içinde fibroz ve diğer hastalıklarda rol oynayan bir kinaz hedefi olan Diskoid Alan Reseptörü 1'i (Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1)) için güçlü inhibitörler keşfetmişlerdir. Elde edilen sonuçları valide etmek için öncelikle bileşikler sentezlemişler ve daha sonra hücre bazlı testlerle biyokimyasal ölçümlerini yapmışlardır. Bu çalışmada elde ettikleri bir öncü aday bileşiğin farelerde farmakokinetiği kanıtlanmıştır. Bu çalışma 46 günde tamamlanmıştır. Bu çalışma bize hızlı ve etkili moleküler tasarım sağlamak için derin öğrenme yöntemlerinin potansiyelini göstermektedir.

Rastgele Orman, sınıflandırma ve regresyon problemlerini bir grup karar ağacı kullanarak çözmek için popüler bir yöntemdir. Dikkatli tanımlayıcı seçimi ve kapsamlı parametre ayarı olmadan bile QSAR modellemesinde çok iyi performans sağlayabilir [50]. NCI-60 gibi hücre hattı panelleri, ilaç adaylarının proliferasyonu inhibe etme yeteneklerini test etmek için uzun süredir kullanılmaktadır. Daha önceleri *in vitro* ilaç duyarlılığının öngörücü modelleri, gen ekspresyon mikrodizilerinden oluşturulan gen ekspresyon belirteci kullanılarak oluşturulmuştur. Bu istatistiksel modeller, orijinal NCI-60'ta olmayan hücre hatları için ilaç yanıtının öngörüsüne izin verebilmektedir [51]. Sınıflandırma ve regresyon ağaçlarına (classification and regression trees, CART) dayanan bir yaklaşım olan Rastgele Orman'ı

kullanarak ilaç cevabının regresyon modellerini oluşturan yeni birçok adımlı algoritma geliştirilerek mevcut teknikler iyileştirilmiştir. Bu yöntem, hem 19 meme kanseri hem de 7 Glioma hücre hattından oluşan bir panel için ilaç yanıtını öngörmeye başarılı olmuş, diferansiyel gen ekspresyonuna dayalı diğer yöntemlerden daha iyi performans göstermiştir. Bahsi geçen yazılım programı R dilinde yazılmış ve ilgili gen ekspresyonu ve ilaç yanıt verileriyle birlikte ivDrug paketi olarak <http://r-forge.r-project.org> adresinde mevcuttur.

Iorio ve arkadaşları [52], gen mutasyon profilleri ve ekspresyon seviyeleri göz önüne alınarak, kanser hücre dizilerinde ilaç moleküllerinin IC₅₀'sini tahmin etmek için elastik ağ modelleri (elastic net models) oluşturmuşlar ve bileşiğe bağlı olarak bir dizi öngörülenlerde doğruluk gözlemişlerdir. Aynı veri setini kullanan Corte's-Ciriano ve arkadaşları ise [53] öngörü performansının bazı durumlarda her bir tahminde istatistiksel güven ölçüsüne bağlı olan RF modeli kullanılarak iyileştirilebileceğini göstermişlerdir.

ALOGPS, ilaç tasarımı (ADME / T ve HTS) ve çevre kimyası çalışmaları için bileşiklerin logP, suda çözünürlük ve pKa'larına ait öngürüler sağlamaktadır. ALOGPS 2.1, ilaç tasarımı çalışmalarında 1-oktanol/su içindeki partiyon katsayılarını, logP'yi ve nötr bileşiklerin sulu çözünürlüğünü öngörmek için geliştirilmiştir. Bu program Associative Neural Networks'ün kendi kendine öğrenme özellikleri aracılığıyla kullanıcı tarafından sağlanan yeni verileri birleştirme yeteneğine sahip olması nedeniyle ayrıcalıklı bir özelliğe sahiptir [54].

Lusci ve arkadaşları, ilaç benzeri moleküllerde suda çözünürlük tahmininde bulunmak için derin öğrenme modelleri bildirmişlerdir [55]. Bu çalışmada kimyasal yapılar grafiğe dönüştürülmüş ve modelleme için yinelemeli sinir ağı yaklaşımları uygulanmıştır.

Ferrero ve arkadaşları, Open Targets [56] platformundan çıkarılan gen-hastalık ilişkisi verilerine dayalı olarak terapötik hedeflerin belirlenmesi üzerinde çalışmışlardır [57]. Araştırmacılar, özellikle belirli bir genin bir ilaç hedefi olma olasılığını öngörebilmek amacıyla RF, SVM, NNs ve Gradyan Artırma Makinesi (Gradient Boosting Machine) gibi makine öğrenmesi modellerini kullanmışlardır [58].

Moleküler dinamik (MD) simülasyonları, reseptör işlevini mekanik olarak açıklayabilmektedir. Plante ve arkadaşları, yakın zamanda MD simülasyonlarının analizine yönelik bir makine öğrenmesi yaklaşımını tanımlamışlardır [59]. Makine öğrenmesi, ligandın neden olduğu reseptör konformasyonel değişiklikleri arasında ayırım yapmak için güçlü bir analiz aracı olarak kullanılabilir, bu da ligandın farmakolojik etkisinde yer alan kalıntıların tanımlanmasına izin verebilmektedir. Geniş bir ligand koleksiyonu incelenerek, makine öğrenmesi yaklaşımları ile potansiyel olarak yeni ilaçların farmakolojik profili sınıflandırabilir. Bu nedenle mekanizmaya dayalı ilaç keşfi için umut verici görünmektedir [60].

Dopamin D3 Reseptörünün (D3DR) etikloprite bağlı inaktif durumunun moleküler dinamik simülasyonları, dört konjenerik modülatördeki etkinlik değişikliğini rasyonelleştirme girişiminde makine öğrenmesine dayalı bir yaklaşım kullanılarak kümelendirilmiştir [61]. Reseptör-ligand komplekslerinin genişletilmiş MD trajektörlerini biriktirerek, ligand esnekliğindeki artışın, inaktive edilmiş reseptörün kristal yapısını aşamalı olarak nasıl destabilize ettiği gözlemlenmiştir. Bu modeli ileriye dönük olarak doğrulamak için, parsiyel bir agonist, yapısal bilgilere ve hesaplamalı modellemeye temelli rasyonel olarak tasarlanmış daha sonra sentezlenip test edilmiştir. Elde edilen sonuçların öngörülerle uyumlu çıktığı görülmüştür. Bu çalışma, genişletilmiş MD simülasyonları çerçevesinde ligand esnekliğinin araştırılmasının ilaç tasarım stratejilerine yardımcı olabileceğini, bilgi verebileceğini ve bunun *in silico'da* (bilgisayar ortamında) işlevsel testlerin güçlü bir karşılığı olarak potansiyel rolünün altını çizebileceğini ileri sürmektedir.

Şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüsü 2'nin (Severe Acute Respiratory Syndrome causing Coronavirus (SARS-CoV-2)) viral proteinleri üzerinde etkili olabilecek ticari olarak kullanılan mevcut ilaçları belirlemek için Molekül Transformatörü-İlaç Hedef Etkileşimi (Molecule Transformer-Drug Target Interaction (MT-DTI)) adı verilen önceden eğitilmiş (pre-trained) derin öğrenme tabanlı ilaç-hedef etkileşim modeli kullanılmış ve sonuç olarak, insan immün yetmezlik virüsünü (HIV) tedavi etmek ve önlemek için kullanılan bir antiretroviral ilaç olan atazanavirin en iyi kimyasal bileşik olduğu ve SARS-CoV-2 3C benzeri proteinaza karşı 94,94 nM'lik bir inhibitör potens ile remdesivir (113.13 nM), efavirenz (199.17 nM), ritonavir (204.05 nM) ve dolutegravir (336.91 nM) den daha etkili olduğu bildirilmiştir [62]. Bu derin öğrenme modeli sayesinde farklı bir viral enfeksiyonun tedavisinde kullanılan antiretroviralin başka bir viral enfeksiyondaki etkinliği ortaya konmuştur.

Green ve arkadaşları, 2020 yılında, kimyasal yapı oluşturma, deneysel tasarım, aktif öğrenme ve kemoinformatik araçlar için metodları entegre eden otomatik moleküler tasarım için Heterojen, Otomatikleştirilmiş İş Akışı kullanan Biyolojik Tepki Analizi ve Tasarım Sistemi (Biological Response Analysis and Design System using an Heterogenous, Automated Workflow (BRADSHAW)) adlı sistemi ortaya koymuşlardır [63]. Bu program, tasarla-yap-test et- analiz et (The Design-Make-Test-Analyse cycle (DMTA)) döngüsünde otomatik moleküler tasarıma izin vermektedir. Basit kullanıcı arayüzü, büyük ölçekli otomatik tasarıma erişimi kolaylaştırırken, çok hızlı hareket eden bir alanda kritik bir gereksinim olan yeni algoritmaları tanıtmak için gereken yazılım geliştirmeyi en aza indirmek için tasarlanmıştır. Sistem, bir otomasyon felsefesi, en iyi uygulama, deneysel tasarım ve hem geleneksel kemoinformatiklerin hem de modern makine öğrenimi algoritmalarının kullanımını içermektedir. Geriye dönük bir durum çalışmasında, BRADSHAW'ın MMP12 inhibitörlerinin tasarımı için öncü bileşik optimizasyonunda nasıl başarılı bir şekilde kullanılabildiği gösterilmiştir.

ADAM'lar (bir disintegrin ve metaloproteinazın kısaltması), hücre yapışması, göç, hücre sel sinyalleme ve proteoliz vb. fizyolojik süreçlerde rol alan transmembran proteinler ailesine aittir [64, 65].

ADAM'ların önemli bir üyesi olan ADAM10'un Alzheimer, prion hastalığı, alerjik reaksiyonlar, glioblastoma ve pankreas kanserinin [66-69] tedavisi için umut verici bir hedef olduğu kanıtlanmıştır. ADAM10 inhibitörlerinin moleküler generatif modelini oluşturmak için, geçişli tekrarlayan birim (Gated-Recurrent-Unit (GRU)) tabanlı derin sinir ağı, transfer öğrenmesi ile birlikte başarıyla kullanılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, GRU tabanlı generatif modelin, moleküllerin SMILES gramerlerini doğru bir şekilde öğrenebildiğini ve yeni potansiyel ADAM10 inhibitörleri üretebildiğini göstermiştir. Geleneksel ligand tabanlı yöntemlerle karşılaştırıldığında, GRU tabanlı generatif model, kimyasal ligandların yalnızca SMILES bilgilerini gerektirir ve etkili geniş bir seri potansiyel yeni yapılar oluşturabilir. Bu benzersiz avantajlar, de novo ilaç tasarımı ve büyük ölçekli sanal tarama araştırmalarında son derece yararlı kılmaktadır [70].

Bu çalışmalara benzer şekilde Segler ve arkadaşları [71], SMILES notasyonunun sözdizimini öğrenmek için tekrarlayan sinir ağlarını kullanmışlar ve daha küçük bir bileşik setiyle önceden eğitilmiş bir ağa ince ayar yaparak hedef odaklı kütüphaneler oluşturmuşlardır. Bu transfer öğrenme yöntemi, biyolojik olarak aktif moleküllerin öngörülmesinde başarıyla kullanılmıştır.

CRISPR / Cas9, gen inaktivasyonu, aktivasyonu, mutasyonu ve kromozom yeniden düzenlemeleri için çok yönlü bir genomik mühendislik aracıdır [72]. Biyoteknoloji uzmanı Christof Fellmann, CRISPR-Cas'ın hedef molekülleri tanımlamaya yardımcı olmasının ilaç keşfi üzerinde çok önemli bir etkiye sahip olacağını açıklamıştır. Araştırmacılar, sistemi kasıtlı olarak genleri aktive etmek veya engellemek için kullanarak hastalığa neden olan veya engelleyen genleri ve proteinleri belirleyebilir, böylece potansiyel ilaçlar için hedefler belirleyebilmektedir. CRISPR – Cas, aynı zamanda, hastalıkları tam olarak taklit eden hücrenel ve tüm hayvan modeli sistemleri oluşturmayı da kolaylaştırmaktadır. Bilim insanlarının ilaçların güvenliğini ve etkinliğini daha doğru bir şekilde doğrulamasına olanak tanıyıp, bu tür modellerin klinik çalışmalarda ne olacağına dair daha iyi öngörücüler olmasını sağlamaktadır [73].

AtomNet, ilaç keşif uygulamaları için küçük moleküllerin biyoaktivitesini tahmin etmek için tasarlanmış ilk yapı tabanlı, derin evrişimli sinir ağıdır [74]. AtomNet, atom tipleri ve yapısal protein-ligand etkileşimi parmak izleri (SPLIF'ler) gibi yapısal özellikleri çıkarmak için ilaç-hedef kompleksine yerleştirilmiş üç boyutlu (3D) bir ızgara (grid) gösterimini kullanır ve bunlar daha sonra tek boyutlu bir kayan nokta vektörüne açılır. AtomNet, bir çalışma setinden gerçek aktif bileşiklere öncelik vermede Surflex-Dock [75] ve DOCK [76] gibi yaygın olarak kullanılan yerleştirme algoritmalarından daha iyi performans göstermiştir.

Klinik araştırmalara giren çoğu ilaç başarısız olur, bu da genellikle ilaç yanıtını yöneten mekanizmaların tam olarak anlaşılmasından kaynaklanır. Makine öğrenimi teknikleri, daha iyi ilaç yanıtı tahminleri için muazzam bir umut vaat ediyor, ancak çoğu yorumlanabilirlik eksikliği ve monoterapilere odaklanmaları nedeniyle klinik uygulamaya ulaşamadı [77]. Bu zorlukları, 1.235 tümör

hücresi hattının 684 ilaca verdiği yanıtlar üzerine eğitilmiş insan kanser hücrelerinin yorumlanabilir bir derin öğrenme modeli olan DrugCell'i geliştirerek ele almışlardır. DrugCell öngörülere hücre hatlarında doğrudur ve ayrıca klinik sonuçları sınıflandırır. DrugCell mekanizmalarının analizi, kombinatoriyal CRISPR, *in vitro* ilaç-ilaç taraması ve hastadan türetilmiş ksenograftlar ile sistematik olarak doğruladıkları sinerjik ilaç kombinasyonlarının tasarımına doğrudan götürür. DrugCell, öngörücü tıp için yorumlanabilir modeller oluşturmak için bir plan sağlamaktadır.

DeepACTION derin öğrenme tabanlı bir yöntemdir. Bu hesaplamalı yaklaşım yeni etkileşimleri (ilaç-hedef çiftleri) belirleyebilir ve ilacın yeniden kullanım sürecini hızlandırabilir. Bu sayede bilim adamlarını ilaç geliştirmeye motive etmek için eksiksiz bilgi sağlayabilmektedir. Yöntem bir doğrulama testi (5 kat CV) altında mevcut algoritmalarla karşılaştırılmış ve deneysel sonuçlar, yöntemin tüm ölçüm metrikleri açısından tahmin performansı elde ettiğini ve DrugBank veri setinden yeni çiftleri (ilaç-hedef) tahmin edebildiğini göstermektedir [78].

DeepCPI, büyük miktarda etiketlenmemiş veriden, bileşiklerin ve proteinlerin örtük ancak etkileyici düşük boyutlu özelliklerini otomatik olarak öğrenen derin öğrenme yöntemini kullanan bir algoritmadır. DeepCPI tarafından başlatılan sanal tarama ile küçük moleküllü bileşiklerin, glukagon benzeri peptid-1 reseptörü (GLP-1R), glukagon reseptörü (GCGR) ve vazodaktif bağırsak peptid reseptörü (VIPR) dahil, G proteinine bağlı reseptör (GPCR) ailesindeki çeşitli hedeflerle etkileşimi belirlenmiştir. Bu durum DeepCPI'nin yeni bileşik-protein etkileşimlerinin öngörüsü için yararlı ve güçlü bir araç olduğunu, bu nedenle ilaç keşfine ve yeniden konumlandırma çabalarına yardımcı olabileceğini göstermektedir [79].

PASS Online, farmakolojik etkiler, etki mekanizmaları, toksik ve yan etkiler dahil olmak üzere 4000'den fazla biyolojik aktivite türünü tahmin etmeye yönelik Bayes yaklaşımının bir örneğidir [80]. Bileşiğin tahmini biyolojik aktivite profilini elde etmek için sadece yapısal formül gereklidir; böylelikle bilgisayarda tasarlanan ancak henüz sentezlenmemiş sanal yapı için bile öngörüle bulunmak mümkündür. Bayes ağının yapı öğrenmesini içeren etiket sınıflandırma yöntemi olan DRABAL, 400.000'den fazla bileşiğin 1,4 milyondan fazla etkileşimini incelemek ve PubChem BioAssay veri tabanından beş büyük HTS testi arasındaki mevcut ilişkileri analiz etmek için geliştirilmiştir [81].

Yakın zamanda, Birleşik Krallık'ta yeni kurulan Exscientia ile Japon ilaç şirketi Sumitomo Dainippon Pharma arasındaki bir iş birliği ile obsesif kompulsif bozukluk için AI kullanılmasıyla tasarlanmış bir ilaç olan DSP-1181 bildirilmiştir [82]. Gelişmiş yapay zekâ metodolojilerinin kullanılması ile, ilgili kimyasal alan verimli bir şekilde daraltılarak, yapay zekâ tarafından tasarlanmış 5-HT_{1A} (5-Hidroksitriptamin 1A) reseptör agonistinin sadece 12 ayda kliniğe ulaşması sağlanmıştır. Normalde bu süreç birkaç yıldan on yıla kadar sürebilirdi.

Genel olarak, AI'nın çeşitli stratejiler yoluyla ilaç keşif verimliliğinde artışlar sağlayabileceği açıktır [26]. Tablo 2'de ilaç geliştirme sürecinde kullanılan bazı yapay zekâ araçları verilmektedir.

Tablo 2. İlaç keşfinde kullanılan yapay zekâ araçlarına örnekler [30].

Araçlar	Ayrıntılar	Web Sitesi URL
DeepChem	İlaç keşfinde uygun bir aday bulmak için python tabanlı bir AI sistemi kullanan MLP modeli	https://github.com/deepchem/deepchem
DeepTox	Toplam 12.000 ilacın toksisitesini tahmin eden yazılım	www.bioinf.jku.at/research/DeepTox
DeepNeuralNetQSAR	Bileşiklerin moleküler aktivitesinin saptanmasına yardımcı olan hesaplama araçlarıyla yönlendirilen Python tabanlı sistem	https://github.com/Merck/DeepNeuralNet-QSAR
ORGANIC	İstenilen özelliklere sahip moleküller oluşturmaya yardımcı olan bir moleküler oluşturma aracı	https://github.com/aspuru-guzik-group/ORGANIC
PotentialNet	Ligandların bağlanma afinitesini tahmin etmek için NN'leri kullanır	https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acscentsci.8b00507
Hit Dexter	Biyokimyasal testlere yanıt verebilecek molekülleri tahmin etmek için ML tekniği	http://hitdexter2.zbh.uni-hamburg.de
DeltaVina	İlaç-ligand bağlanma afinitesini yeniden puanlamak için bir puanlama işlevi	https://github.com/chengwang88/deltavina
Neural graph fingerprint	Yeni moleküllerin özelliklerini tahmin etmeye yardımcı olur	https://github.com/HIPS/neural-fingerprint
AlphaFold	Proteinlerin 3 boyutlu yapılarını tahmin eder	https://deepmind.com/blog/alphafold
Chemputer	Kimyasal sentez prosedürünün standart formatta raporlanmasına yardımcı olur	https://zenodo.org/record/1481731

Yapay Zekâ Uygulamalarına İlişkin Dezavantajlar

Yapay zekâ teknolojisi, özellikle derin öğrenme yöntemi, farmasötik bilgileri (örneğin, QSAR ve kimyasal yapı) büyük miktarda farmasötik veriden öğrenmek için kullanılabilir. Öğrenilen bilgi daha sonra molekülü istenilen özelliklere sahip olarak tasarlamak, moleküler özellikleri optimize etmek ve molekülün klinik onay başarı oranını ilerletmek için uygulanabilir. Yapay zekâ teknolojisi, güçlü veri madenciliği yetenekleri sayesinde bilgisayar destekli ilaç tasarımına yeni bir soluk getirmiştir. Ancak bazı sorunlar mevcuttur [83].

Tıbbi araştırmalarda yapay zekânın karşılaştığı veri eksikliği, birlikte çalışabilirlik eksikliği ve boyutluluk gibi birçok zorluklar bulunmaktadır [26]. Veri eksikliği, yapay zekâyı uygulamak isteyen her sektörde tekrar eden bir sorundur. Geleneksel bir biyolojik çalışmanın geçerli olması için minimum örnek sayısı beş olmalıdır. Bununla birlikte, çoğu makine öğrenmesi algoritmasının iyi performans göstermesi için yüzlerce veya binlerce veri noktası / örneği üzerinde eğitilmesi gerekir. Ayrıca,

etiketlenmiş verileri elde etmek zor olabilir çünkü bu genellikle bir tür manuel girdi gerektirir. Bazı durumlarda istenen verileri içeren büyük veritabanları mevcut olmayabilir. Bununla mücadele etmek için stratejilerden biri veri artırmadır. Veri artırma, gerçek verilerden yapay veri oluşturma sürecidir. Çeşitli veri artırma yaklaşımları vardır; nihayetinde yeni veri toplamadan eğitim modelleri için mevcut verileri artırır [26]. Diğer bir yaklaşım transfer öğrenme teknolojisinin geliştirilmesi olabilir [83].

Tahmine dayalı modeller oluşturmak için deneysel verileri kullanırken bir başka zorluk ve belirsizlik kaynağı, verilerin yanlışlıkla doğru bildirilmemesidir. Yanlış raporlama, bilimsel literatürde rapor edilen ve veri tabanlarında saklanan rapor edilen değerlerde, gen tanımlayıcılarında, birimlerde veya diğer parametrelerde basit yazım hataları şeklinde olabilir. Yanlış bildirilen bir veya iki veri noktası bile tahmine dayalı bir modelin sonuçlarını çarpıtma potansiyeline sahiptir. Veri iyileştirme ve veri raporlamadaki olası hataların belirlenmesi, yapay zekânın ilaç keşfiyle ilgili olabileceği başka bir alandır [84].

Makine öğrenmesinin karşı karşıya kaldığı bir diğer zorluk da modelin hala gizemini koruyor olmasıdır. Uygulanabilirlik alanlarının ortaya çıkmasına benzer şekilde, yeni AI araçlarını doğrulamak ve değerlendirmek için hangi uygun kontrollerin olduğu konusunda topluluk arasında bir fikir birliğine varılması gerekir [85]. 'Kara kutu modeli' terimi genellikle bir modelin nasıl belirli tahminlerde bulunduğunu ve performans gösterdiğini açıklamak zor olduğunda kullanılır. Çoğu makine öğrenmesi modeli, tahmin edilen sonuçların altında yatan biyolojik mekanizmalar hakkında bilgi sahibi olmadan veya bunlara dikkat etmeden tahmin doğruluğu için optimize edilmiş "kara kutular"dır [86, 87]. Her katman modele karmaşıklık kattığından, her katmanın çıktılarını katlanarak karmaşık hale getirebileceğinden ve katman sayısı arttığından, bu durum daha olasıdır. Ancak, Yerel Yorumlanabilir Model-Agnostik Açıklamalar (Local Interpretable Model-agnostic Explanations (LIME)) [88] ve SHapley Katkı Açıklamaları (Shapely Additive Explanations (SHAP)) gibi daha fazla açıklanabilirliği aydınlatmak için çeşitli araçlar geliştirilmektedir [89]. LIME, modelin davranışının yerel doğrusal bir yaklaşımını benimser, SHAP ise model çıktısını açıklamak için oyun teorisine dayalı bir yaklaşım kullanır. Hem LIME hem de SHAP ve diğer benzer stratejilerin makine öğrenmesinde yaygın uygulama haline geleceği ve kliniğe daha fazla AI teknolojisi getirmek için gerekli olacağı öngörülmektedir [26].

Tıbbi verilerde yapay zekâ ile tekrar eden bir sorun, boyutluluk laneti olarak bilinir. Bu, kullanılan veri setlerinin az sayıda örneğe ve birçok özelliğe sahip olduğu zamandır. Bu, tipik olarak binlerce özellik ve 100'den az örnek verdikleri için tıbbi omik veri setlerinde yaygın bir durumdur; böylece mevcut veriler seyrekleşir. Bu sorun, çeşitli boyut indirgeme teknikleriyle ele alınabilir [26]. Sinir ağı modellerini eğitmek birçok parametrenin ayarlanmasını içerir, ancak yalnızca birkaç pratik kılavuz vardır ve bu modellerin optimizasyonları için eksiksiz teorik sistemler hala ulaşılamazdır [83].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Hesaplama gücünün hızlı gelişimi ve hesaplamalı kimya ve biyolojinin hızlı gelişimi sayesinde, bilgisayar destekli ilaç tasarım teknikleri, araştırma sürecini hızlandırmak için ilaç keşif ve geliştirme hattının hemen hemen her aşamasında başarıyla uygulanmıştır [83]. Ana hedef prelinik ve klinik araştırmalarla ilgili maliyeti ve riski azaltmaktır. Yapay zekâ teknolojisi, makine öğrenimi teorisinin gelişimi ve farmakolojik verilerin birikmesi sayesinde, güçlü bir veri madenciliği aracı olarak, sanal tarama, aktivite öngörme, QSAR analizi de nova ilaç tasarımı ve *in silico* absorpsiyon, dağılma, metabolizma, atılım ve toksisite (ADME/T) özelliklerinin değerlendirilmesi gibi ilaç tasarımının çeşitli alanlarında rol oynamaktadır. Yapay zekâ tabanlı modellerin fiziksel bir açıklamasını sağlamak hala zor olsa da aslında çok yönlü sistemler aracılığıyla ilaç keşfinin manipüle edilmesine yardımcı olmak için büyük bir güç olarak hareket etmektedir. Son zamanlarda, güçlü tümevarım yeteneği ve güçlü özellik ekstraksiyon yeteneği nedeniyle, moleküler özelliklerin öngörülmesinin yanı sıra, ilaç tasarımı alanında AI teknolojilerinin uygulanmasını daha da teşvik edecek olan istenen molekülleri oluşturmada derin öğrenme yöntemleri kullanılmaktadır.

Yapay zekâ, ilaç keşfinin ilk aşamalarından başlayarak tamamıyla *in silico* ortamda istenen aktiviteyi gösteren yeni öncü bileşikler geliştirmek için kullanılmaktadır [90]. Hesaplamalı *de novo* tasarımı ile yapay zekâyı birleştirmek, bilinen yararlı bileşiklerin öğrenilmesine ve planlı bir biyolojik aktivite ile kimyasal olarak doğru ve sentezlenebilir yapıların üretilmesine olanak sağlayabilmektedir [91]. Bu uygulamalar sayesinde emek, zaman, maliyet ve bunun gibi birçok konuda tasarruf ve avantaj sağlanmaktadır. Yapay zekâ uygulamalarının giderek yaygınlaşmasının sebebi bu avantaj ve tasarruflardır.

Şu anda, birçok ilaç şirketi ilaç geliştirme programlarında artan maliyetler ve verimliliğin azalması nedeniyle zorluklarla karşılaşmaktadır [3]. Son zamanlarda, bu süreçleri daha maliyet ve zaman açısından verimli hale getirebilecek birçok etkileyici yapay zekâ yöntemi ve aracı geliştirilmiştir. İlaç taramasında AI / ML kullanımı buna bir örnektir. Geleneksel yüksek verimli tarama kütüphanesi genellikle yaklaşık bir milyon bileşik içerir ve her bir bileşik tipik olarak 50-100 Amerikan Doları tutarındadır. Bu nedenle, bir ilk tarama süreci birkaç milyon Amerikan dolarına ve birkaç aylık çalışmaya mal olabilir. Sonraki öncü bileşik optimizasyonunun, prelinik ilaç adaylarının belirlenmesi birkaç yıl sürebilir. Aksine, AI yardımıyla, birkaç milyar molekülden oluşan sanal bir bileşik kitaplığı birkaç gün içinde taranabilir. Yapay zekâ tabanlı bir hesaplama hattı kullanarak klinik öncesi adayları belirlemek yalnızca birkaç ay ile 1 yıl sürebilir [88, 92].

Yapay zekâ tabanlı hesaplamalı yaklaşımların ilaç geliştirme üzerindeki büyük etkisi göz önüne alındığında, bu alandaki yönelimlerin ve bu alana başvuranların sayısı hızla artmaktadır. Dahası, birçok

ilaç şirketi, 2017'den beri yapay zekâ girişimleri ve akademik kurumlarla iş birliği yapmanın yanı sıra dahili yapay zekâ tabanlı Ar-Ge programlarına yatırım yapmaktadır.

Bugüne kadar, yapay zekânın klinik deneyler için hızlı bir şekilde kullanılabilir hale getirilebilecek ve onaylanırsa sağlık hizmetleri ile birleştirilebilecek yeni aday tedavileri belirleme potansiyeli benzersiz olup yapay zekâyı ileri teknolojilerin merkezi haline getirmektedir. Bu nedenle AI, insan hastalıkları, özellikle de Koronavirüs Hastalığı 2019 (Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)) gibi yeni ortaya çıkan hastalıklar için ilaç geliştirme ve mevcut ilaçların yeniden kullanılması için umut vericidir [93].

Son olarak, DL yöntemlerinin hala "karanlık bir sır" veya "kara kutu" olduğunu vurgulamak önemlidir [88]. Eğitim aşamasında, bir sinir ağına yalnızca etiketli belirli bir girdi verilir. Özellikler açıkça belirtilmemiştir ve ağı oluşturan kişi bile ara aşamalarda neyin incelendiğini veya modelin neden belirli bir sonuca vardığını bilemeyebilir [94]. Sonuç olarak, ilaç keşif döngüsünü hızlandırıp yapay zekâ araçlarını sisteme dahil etmek için büyük miktarda çalışma yapılmıştır; ancak ilaç keşfinde yapay zekânın tam potansiyeli gerçekleştirilmeden önce bu araçların daha başarılı uygulamaları gerekli olacaktır [39].

YAZAR KATKILARI

Kavram: *R.T., İ.Y.*; Tasarım: *İ.N.Ç., F.K.A., R.T., İ.Y.*; Denetim: *İ.N.Ç., F.K.A., İ.Y.*; Kaynaklar: -; Malzemeler: -; Veri toplama ve/veya işleme: -; Analiz ve/veya yorumlama: *İ.N.Ç., İ.Y.*; Literatür taraması: *İ.N.Ç., F.K.A., R.T.*; Makalenin yazılması: *İ.N.Ç., İ.Y.*; Kritik inceleme: *İ.Y.*; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Schneider, P., Walters, W. P., Plowright, A. T., Sieroka, N., Listgarten, J., Goodnow, R. A., Fisher, J., Jansen, J. M., Duca, J. S., Rush, T. S., Zentgraf, M., Hill, J. E., Krutoholow, E., Kohler, M., Blaney, J., Funatsu, K., Luebke, C., Schneider, G. (2020). Rethinking Drug Design in The Artificial Intelligence Era. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(5), 353–364. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0050-3>
2. Lo, Y. C., Ren, G., Honda, H., Davis, K. L. (2019). Artificial Intelligence-Based Drug Design and Discovery. *ChemInformatics and Its Applications. Drug Discovery Today*. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.89012>

3. Mak, K. K., Pichika, M. R. (2019). Artificial intelligence in drug development: present status and future prospects. *Drug Discovery Today*, 24(3), 773–780. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.11.014>
4. AI for Chemistry Web Site. Retrieved December 20, 2020, from <https://chemintelligence.com/ai-for-chemistry>
5. McCarthy, J., Hayes, P. (1969). Some Philosophical Problems From the Standpoint of Artificial Intelligence. In *Machine Intelligence*; Edinburgh University Press: Edinburgh, Retrieved from <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.85.5082>
6. Yang, X., Wang, Y., Byrne, R., Schneider, G., Yang, S. (2019). Concepts of Artificial Intelligence for Computer-Assisted Drug Discovery. *Chemical Reviews*, 119(18), 10520–10594. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00728>
7. Barr, A.; Feigenbaum, E. A.; Cohen, P. R. (1982). *Handbook of Artificial Intelligence*; Addison-Wesley Longman: Boston, MA, USA.
8. Popovic, D., Bhatkar, V. P. (1994). *Methods and Tools for Applied Artificial Intelligence*; Marcel Dekker: New York.
9. Bobrow, D. G. (1964). Natural Language Input for a Computer Problem Solving System. In *Semantic Information Processing*; MIT Press: Cambridge.
10. Weizenbaum, J. (1966). ELIZA---a computer program for the study of natural language communication between man and machine. *Communications of the ACM*, 9(1), 36–45. <https://doi.org/10.1145/365153.365168>
11. Baum, E. B. (1988). On the capabilities of multilayer perceptrons. *Journal of Complexity*, 4(3), 193–215. [https://doi.org/10.1016/0885-064X\(88\)90020-9](https://doi.org/10.1016/0885-064X(88)90020-9)
12. Rumelhart, D. E., Hinton, G. E., Williams, R. J. (1986). Learning internal representations by error propagation. In *Parallel Distributed Processing: Explorations in the Microstructure of Cognition*. MIT Press: Cambridge.
13. Qian, N., Sejnowski, T. J. (1988). Predicting the secondary structure of globular proteins using neural network models. *Journal of Molecular Biology*, 202(4), 865–884. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90564-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90564-5)
14. Hammett, L. P. (1937). The Effect of Structure upon the Reactions of Organic Compounds. Benzene Derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 59(1), 96–103. <https://doi.org/10.1021/ja01280a022>
15. Hansch, C., Fujita, T. (1964). ρ - σ - π Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. *Journal of the American Chemical Society*, 86(8), 1616–1626. <https://doi.org/10.1021/ja01062a035>
16. Miller, E., Hansch, C. (1967). Structure-Activity Analysis of Tetrahydrofolate Analogs Using Substituent Constants and Regression Analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56(1), 92–97. <https://doi.org/10.1002/jps.2600560119>

17. Kopecký, J., Boček, K., Vlachová, D. (1965). Chemical Structure and Biological Activity on m- and p-Disubstituted Derivatives of Benzene. *Nature*, 207(5000), 981–981. <https://doi.org/10.1038/207981a0>
18. Wessel, M. D., Jurs, P. C., Tolan, J. W., Muskal, S. M. (1998). Prediction of human intestinal absorption of drug compounds from molecular structure. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 38(4), 726–735. <https://doi.org/10.1021/ci980029a>
19. Martin Y. C. (2010). *Quantitative Drug Design: A Critical Introduction*. Boca Raton, FL: CRC Press. 2nd ed.
20. Basile, A. O., Yahi, A., Tatonetti, N. P. (2019). Artificial Intelligence for Drug Toxicity and Safety. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(9), 624–635. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.07.005>
21. Zhu, H. (2020). Big data and artificial intelligence modeling for drug discovery. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 60(1), 573–589. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010919-023324>
22. Bunney, P. E., Zink, A. N., Holm, A. A., Billington, C. J., Kotz, C. M. (2017). Orexin activation counteracts decreases in nonexercise activity thermogenesis (NEAT) caused by high-fat diet. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
23. Properzi, F., Taylor, K., Steedman, M. (2019). Accelerating drug discovery. *Intelligent drug discovery powered by AI*. 2-7. Retrieved from <https://blogs.deloitte.co.uk/health/>
24. Panteleev, J., Gao, H., Jia, L. (2018). Recent applications of machine learning in medicinal chemistry. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 28(17), 2807–2815. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.06.046>
25. D'Souza, S., Prema, K. V., Balaji, S. (2020). Machine learning models for drug–target interactions: current knowledge and future directions. *Drug Discovery Today*, 25(4), 748–756. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.03.003>
26. Linton-Reid, K. (2020). Introduction: An Overview of AI in Oncology Drug Discovery and Development. *Artificial Intelligence in Oncology Drug Discovery and Development*, (M1), 1–13. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92799>
27. Ippolito, M., Ferguson, J., Jenson, F. (2020). Improving facies prediction by combining supervised and unsupervised learning methods. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 200, 108300. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2020.108300>
28. Civelek, Ö. (2003). Bulanık Mantık Nedir Yapay Zekâ Nedir. *Türkiye Mühendislik Haberleri Dergisi*, 423(1), 40–50.
29. Bohr, H. (2020). Drug discovery and molecular modeling using artificial intelligence. *In Artificial Intelligence in Healthcare*, pp. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818438-7.00003-4>
30. Paul, D., Sanap, G., Shenoy, S., Kalyane, D., Kalia, K., Tekade, R. K. (2020). Artificial intelligence in drug discovery and development. *Drug Discovery Today*, 26(1), 80–93. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.10.010>

31. Chen, H., Engkvist, O., Wang, Y., Olivecrona, M., Blaschke, T. (2018). The rise of deep learning in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 23(6), 1241–1250. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.039>
32. Jing, Y., Bian, Y., Hu, Z., Wang, L., Xie, X. Q. S. (2018). Deep Learning for Drug Design: an Artificial Intelligence Paradigm for Drug Discovery in the Big Data Era. *AAPS Journal*, 20(3), 58. <https://doi.org/10.1208/s12248-018-0210-0>
33. Zhavoronkov, A. (2018). Artificial Intelligence for Drug Discovery, Biomarker Development, and Generation of Novel Chemistry. *Molecular Pharmaceutics*, 15(10), 4311–4313. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00930>
34. Gunavathi, C., Sivasubramanian, K., Keerthika, P., Paramasivam, C. (2020). A review on convolutional neural network based deep learning methods in gene expression data for disease diagnosis. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.10.263>
35. Hubel, D. H., Wiesel, T. N. (1962). Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *The Journal of Physiology*, 160(1), 106–154. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1962.sp006837>
36. Hubel, D. H., Wiesel, T. N. (1959). Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. *The Journal of Physiology*, 148(3), 574–591. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1959.sp006308>
37. Bilski, J., Rutkowski, L., Smolağ, J., Tao, D. (2021). A novel method for speed training acceleration of recurrent neural networks. *Information Sciences*, 553, 266–279. <https://doi.org/10.1016/j.ins.2020.10.025>
38. Big pharma is using AI and machine learning in drug discovery and development to save lives Web Site. Retrieved December 20, 2020, from <https://www.businessinsider.com/ai-machine-learning-in-drug-discovery-development-2020>
39. Chan, H. C. S., Shan, H., Dahoun, T., Vogel, H., Yuan, S. (2019). Advancing Drug Discovery via Artificial Intelligence. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(8), 592–604. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.06.004>
40. Rubio, D. M. G., Schoenbaum, E. E., Lee, L. S., Schteingart, D. E., Marantz, P. R., Anderson, K. E., Platt, L. D., Baez, A., Esposito, K. (2010). Defining translational research: Implications for training. *Academic Medicine*, 85(3), 470–475. <https://doi.org/10.1097/ACM.0b013e3181ccd618>
41. Merck Molecular Activity Challenge. Retrieved December 20, 2020, from <https://www.kaggle.com/c/MerckActivity>
42. DeepCodex: a deep code for gene expression data. Retrieved December 20, 2020, from <http://deepcodex.org>
43. Donner, Y., Kazmierczak, S., Fortney, K. (2018). Drug Repurposing Using Deep Embeddings of Gene Expression Profiles. *Molecular Pharmaceutics*, 15(10), 4314–4325. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00284>
44. Xie, L., He, S., Song, X., Bo, X., Zhang, Z. (2018). Deep learning-based transcriptome data classification for drug-target interaction prediction. *BMC Genomics*, 19(7), 93-102.

<https://doi.org/10.1186/s12864-018-5031-0>

45. Vanhaelen, Q., Mamoshina, P., Aliper, A. M., Artemov, A., Lezhnina, K., Ozerov, I., Labat, I., Zhavoronkov, A. (2017). Design of efficient computational workflows for in silico drug repurposing. *Drug Discovery Today*, 22(2), 210–222. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.09.019>
46. Aliper, A., Jellen, L., Cortese, F., Artemov, A., Semper, D. K., Moskalev, A., Swick, A. G., Zhavoronkov, A. (2017). Towards natural mimetics of metformin and rapamycin. *Aging*, 9(11), 2245–2268. <https://doi.org/10.18632/aging.101319>
47. Gayvert, K. M., Madhukar, N. S., Elemento, O. (2016). A Data-Driven Approach to Predicting Successes and Failures of Clinical Trials. *Cell Chemical Biology*, 23(10), 1294–1301. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.07.023>
48. Mayr, A., Klambauer, G., Unterthiner, T., Hochreiter, S. (2016). DeepTox: Toxicity prediction using deep learning. *Frontiers in Environmental Science*, 3(80). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00080>
49. Zhavoronkov, A., Ivanenkov, Y. A., Aliper, A., Veselov, M. S., Aladinskiy, V. A., Aladinskaya, A. V., Terentiev, V. A., Polykovskiy, D. A., Kuznetsov, M. D., Asadulaev, A., Volkov, Y., Zholus, A., Shayakhmetov, R. R., Zhebrak, A., Minaeva, L. I., Zagribelnyy, B. A., Lee, L. H., Soll, R., Madge, D., Xing, L., Guo, T., Aspuru-Guzik, A. (2019). Deep learning enables rapid identification of potent DDR1 kinase inhibitors. *Nature Biotechnology*, 37(9), 1038–1040. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0224-x>
50. Hessler, G., Baringhaus, K. H. (2018). Artificial intelligence in drug design. *Molecules*, 23(10), 2520. <https://doi.org/10.3390/molecules23102520>
51. Riddick, G., Song, H., Ahn, S., Walling, J., Borges-Rivera, D., Zhang, W., Fine, H. A. (2011). Predicting in vitro drug sensitivity using random forests. *Bioinformatics*, 27(2), 220–224. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq628>
52. Iorio, F., Knijnenburg, T. A., Vis, D. J., Bignell, G. R., Menden, M. P., Schubert, M., Aben, N., Gonçalves, E., Barthorpe, S., Lightfoot, H., Cokelaer, T., Greninger, P., Syk, E. V., Chang, H., Silva, H. D., Heyn, H., Deng, X., Egan, R.K., Liu, Q., Mironenko, T., Mitropoulos, X., Richardson, L., Wang, J., Zhang, T., Moran, S., Sayols, S., Soleimani, M., Tamborero, D., Lopez-Bigas, N., Ross-Macdonald, P., Esteller, M., Gray, N. S., Haber, D. A., Stratton, M. R., Benes, C. H., Wessels, L. F. A., Saez-Rodriguez, J., McDermott, U., Garnett, M. J. (2016). A Landscape of Pharmacogenomic Interactions in Cancer. *Cell*, 166(3), 740–754. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.017>
53. Cortés-Ciriano, I., Van Westen, G. J. P., Bouvier, G., Nilges, M., Overington, J. P., Bender, A., Malliavin, T. E. (2016). Improved large-scale prediction of growth inhibition patterns using the NCI60 cancer cell line panel. *Bioinformatics*, 32(1), 85–95. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv529>
54. Tetko, I. V., Bruneau, P. (2004). Application of ALOGPS to predict 1-octanol/water distribution coefficients, logP, and logD, of AstraZeneca in-house database. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(12), 3103–3110. <https://doi.org/10.1002/jps.20217>
55. Lusci, A., Pollastri, G., Baldi, P. (2013). Deep architectures and deep learning in cheminformatics: The prediction of aqueous solubility for drug-like molecules. *Journal of*

- Chemical Information and Modeling*, 53(7), 1563–1575. <https://doi.org/10.1021/ci400187y>
56. Koscielny, G., An, P., Carvalho-Silva, D., Cham, J. A., Fumis, L., Gasparyan, R., Hasan, S., Karamanis, N., Maguire, M., Papa, E., Pierleoni, A., Pignatelli, M., Platt, T., Rowland, W., Wankar, P., Pento, A. P., Burdett, T., Fabregat, A., Forbes, S., Gaulton, A., Gonzalez, C. Y., Hermjakob, H., Hersey, A., Jupe, S., Kafkas, Ş., Keays, M., Leroy, C., Lopez, F. J., Magarinos, M. P., Malone, J., McEntyre, J., Fuentes, A. M. P., O'Donovan, C., Papatheodorou, I., Parkinson, H., Palka, B., Paschall, J., Petryszak, R., Pratanwanich, N., Sarntivijal, S., Saunders, G., Sidiropoulos, K., Smith, T., Sondka, Z., Stegle, O., Tang, Y. A., Turner, E., Vaughan, B., Vrousou, O., Watkins, X., Martin, M. J., Sanseau, P., Vamathevan, J., Birney, E., Barrett, J., Dunham, I. (2017). Open Targets: A platform for therapeutic target identification and Validation. *Nucleic Acids Research*, 45(1), 985–994. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1055>
 57. Ferrero, E., Dunham, I., Sanseau, P. (2017). In silico prediction of novel therapeutic targets using gene-disease association data. *Journal of Translational Medicine*, 15(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1285-6>
 58. Cavasotto, C. N., Di Filippo, J. I. (2021). Artificial intelligence in the early stages of drug discovery. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 698, 108730. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108730>
 59. Plante, A., Shore, D. M., Morra, G., Khelashvili, G., Weinstein, H. (2019). A Machine Learning Approach for the Discovery of Ligand-Specific Functional Mechanisms of GPCRs. *Molecules*, 24(11), 2097. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24112097>
 60. Díaz, Ó., Dalton, J. A. R., Giraldo, J. (2019). Artificial Intelligence: A Novel Approach for Drug Discovery. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(8), 550–551. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.06.005>
 61. Ferraro, M., Decherchi, S., De Simone, A., Recanatini, M., Cavalli, A., Bottegoni, G. (2020). Multi-target dopamine D3 receptor modulators: Actionable knowledge for drug design from molecular dynamics and machine learning. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 188, 111975. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111975>
 62. Beck, B. R., Shin, B., Choi, Y., Park, S., Kang, K. (2020). Predicting commercially available antiviral drugs that may act on the novel coronavirus (SARS-CoV-2) through a drug-target interaction deep learning model. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 784–790. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.03.025>
 63. Green, D. V. S., Pickett, S., Luscombe, C., Senger, S., Marcus, D., Meslamani, J., Brett, D., Powell, A., Masson, J. (2020). BRADSHAW: a system for automated molecular design. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 34(7), 747–765. <https://doi.org/10.1007/s10822-019-00234-8>
 64. Camodeca, C., Nuti, E., Tepshi, L., Boero, S., Tuccinardi, T., Stura, E. A., Poggi, A., Zocchi, M. R., Rossello, A. (2016). Discovery of a new selective inhibitor of A Disintegrin and Metalloprotease 10 (ADAM-10) able to reduce the shedding of NKG2D ligands in Hodgkin's lymphoma cell models. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 111, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.053>
 65. Healy, E. F., Romano, P., Mejia, M., Lindfors, G. (2010). Acetylenic inhibitors of ADAM10 and ADAM17: In silico analysis of potency and selectivity. *Journal of Molecular Graphics and*

- Modelling*, 29(3), 436–442. <https://doi.org/10.1016/j.jmngm.2010.08.006>
66. Tippmann, F., Hundt, J., Schneider, A., Endres, K., Fahrenholz, F. (2009). Up-regulation of the α -secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *The FASEB Journal*, 23(6), 1643–1654. <https://doi.org/10.1096/fj.08-121392>
67. Altmeppen, H. C., Prox, J., Krasemann, S., Puig, B., Kruszewski, K., Dohler, F., Bernreuther, C., Hoxha, A., Linsenmeier, L., Sikorska, B., Liberski, P. P., Bartsch, U., Saftig, P., Glatze, M. (2015). The sheddase ADAM10 is a potent modulator of prion disease. *ELife*, 2015(4), 1–50. <https://doi.org/10.7554/eLife.04260>
68. Kohutek, Z. A., DiPierro, C. G., Redpath, G. T., Hussaini, I. M. (2009). ADAM-10-Mediated N-Cadherin Cleavage Is Protein Kinase C- α Dependent and Promotes Glioblastoma Cell Migration. *Journal of Neuroscience*, 29(14), 4605–4615. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5126-08.2009>
69. Woods, N., Trevino, J., Coppola, D., Chellappan, S., Yang, S., Padmanabhan, J. (2015). Fendiline inhibits proliferation and invasion of pancreatic cancer cells by interfering with ADAM10 activation and β -catenin signaling. *Oncotarget*, 6(34), 35931–35948. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5933>
70. Shi, T., Huang, S., Chen, L., Heng, Y., Kuang, Z., Xu, L., Mei, H. (2020). A molecular generative model of ADAM10 inhibitors by using GRU-based deep neural network and transfer learning. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 205, 104122. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104122>
71. Segler, M. H. S., Kogej, T., Tyrchan, C., Waller, M. P. (2018). Generating focused molecule libraries for drug discovery with recurrent neural networks. *ACS Central Science*, 4(1), 120–131. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00512>
72. Luo, J. (2016). CRISPR/Cas9: From Genome Engineering to Cancer Drug Discovery. *Trends in Cancer*, 2(6), 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.05.001>
73. Scott, A. (2018). A CRISPR path to drug discovery. *Nature*, 555, 10–11. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-02477-1>
74. Wallach, I., Dzamba, M., Heifets, A. (2015). *AtomNet: A Deep Convolutional Neural Network for Bioactivity Prediction in Structure-based Drug Discovery*. 1–11. Retrieved from <http://arxiv.org/abs/1510.02855>
75. Spitzer, R., Jain, A. N. (2012). Surflex-Dock: Docking benchmarks and real-world application. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 26(6), 687–699. <https://doi.org/10.1007/s10822-011-9533-y>
76. Allen, W. J., Balius, T. E., Mukherjee, S., Brozell, S. R., Moustakas, D. T., Lang, P. T., Case, D. A., Kuntz, I. D., Rizzo, R. C. (2015). DOCK 6: Impact of new features and current docking performance. *Journal of Computational Chemistry*, 36(15), 1132–1156. <https://doi.org/10.1002/jcc.23905>
77. Kuenzi, B. M., Park, J., Fong, S. H., Sanchez, K. S., Lee, J., Kreisberg, J. F., Ma, J., Ideker, T. (2020). Predicting Drug Response and Synergy Using a Deep Learning Model of Human Cancer

- Cells. *Cancer Cell*, 38(5), 672-684. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.09.014>
78. Hasan Mahmud, S. M., Chen, W., Jahan, H., Dai, B., Din, S. U., Dzisoo, A. M. (2020). DeepACTION: A deep learning-based method for predicting novel drug-target interactions. *Analytical Biochemistry*, 610, 113978. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113978>
79. Wan, F., Zhu, Y., Hu, H., Dai, A., Cai, X., Chen, L., Gong, H., Xia, T., Yang, D., Wang, M. W., Zeng, J. (2019). DeepCPI: A Deep Learning-based Framework for Large-scale in silico Drug Screening. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 17(5), 478-495. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2019.04.003>
80. Lagunin, A., Zakharov, A., Filimonov, D., Poroikov, V. (2011). QSAR modelling of rat acute toxicity on the basis of PASS prediction. *Molecular Informatics*, 30(2-3), 241-250. <https://doi.org/10.1002/minf.201000151>
81. Soufan, O., Ba-Alawi, W., Afeef, M., Essack, M., Kalnis, P., Bajic, V. B. (2016). DRABAL: novel method to mine large high-throughput screening assays using Bayesian active learning. *Journal of Cheminformatics*, 8(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0177-8>
82. Malandraki-Miller, S., Riley, P. R. (2021). Use of artificial intelligence to enhance phenotypic drug discovery. *Drug Discovery Today*. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.01.013>
83. Zhong, F., Xing, J., Li, X., Liu, X., Fu, Z., Xiong, Z., Lu, D., Wu, X., Zhao, J., Tan, X., Li, F., Luo, X., Li, Z., Chen, K., Zheng, M., Jiang, H. (2018). Artificial intelligence in drug design. *Science China Life Sciences*, 61(10), 1191-1204. <https://doi.org/10.1007/s11427-018-9342-2>
84. Kalliokoski, T., Kramer, C., Vulpetti, A., Gedeck, P. (2013). Comparability of Mixed IC50 Data -A Statistical Analysis. *PLoS ONE*, 8(4), 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061007>
85. Solomon, S. M. (2020). Genome editing in animals: why FDA regulation matters. *Nature Biotechnology*, 38(2), 142-143. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0413-7>
86. Ching, T., Himmelstein, D. S., Beaulieu-Jones, B. K., Kalinin, A. A., Do, B. T., Way, G. P., Ferrero, E., Agapow, P.M., Zietz, M., Hoffman, M. M., Xie, W., Rosen, G. L., Lengerich, B.J., Israeli, J., Lanchantin, J., Woloszynek, S., Carpenter, A. E., Shrikumar, A., Xu, J., Cofer, E.M. Lavender, C.A., Turaga, S. C., Alexandari, A. M., Lu, Z., Harris, D. J., DeCaprio, D., Qi, Y., Kundaje, A., Peng, Y., Wiley, L. K., Segler, M. H. S., Boca, S. M., Swamidass, S. J., Huang, A., Gitter, A., Greene, C. S. (2018). Opportunities and obstacles for deep learning in biology and medicine. *Journal of The Royal Society Interface*, 15(141). <https://doi.org/10.1101/142760>
87. Carlini, N., Liu, C., Erlingsson, Ú., Kos, J., Song, D. (2019). The secret Sharer: Evaluating and testing unintended memorization in neural networks. In *Proceedings of the 28th USENIX Security Symposium*, (pp. 267-284). Santa Clara, CA, USA.
88. Voosen, P. (2017). The AI detectives. *Science*, 357(6346), 22-27. <https://doi.org/10.1126/science.357.6346.22>
89. Tishby, N., Zaslavsky, N. (2015). Deep learning and the information bottleneck principle. In *Proceedings of the 2015 IEEE Information Theory Workshop (ITW)*, (pp. 1-5). Jeju Island, Korea. <https://doi.org/10.1109/ITW.2015.7133169>
90. Merk, D., Friedrich, L., Grisoni, F., Schneider, G. (2018). De Novo Design of Bioactive Small Molecules by Artificial Intelligence. *Molecular Informatics*, 37(1-2).

<https://doi.org/10.1002/minf.201700153>

91. Lake, F. (2019). Artificial intelligence in drug discovery: what is new, and what is next? *Future Drug Discovery*, 1(2). <https://doi.org/10.4155/fdd-2019-0025>
92. Hassan Baig, M., Ahmad, K., Roy, S., Mohammad Ashraf, J., Adil, M., Haris Siddiqui, M., Khan, S., Amjad Kamal, M., Provazník, I., Choi, I. (2016). Computer Aided Drug Design: Success and Limitations. *Current Pharmaceutical Design*, 22(5), 572–581. <https://doi.org/10.2174/1381612822666151125000550>
93. Zhou, Y., Wang, F., Tang, J., Nussinov, R., Cheng, F. (2020). Artificial intelligence in COVID-19 drug repurposing. *The Lancet Digital Health*, 2(12), 667–676. [https://doi.org/10.1016/S2589-7500\(20\)30192-8](https://doi.org/10.1016/S2589-7500(20)30192-8)
94. Lecun, Y., Bengio, Y., Hinton, G. (2015). Deep learning. *Nature*, 521(7553), 436–444. <https://doi.org/10.1038/nature14539>



KATI LİPİT NANOPARTİKÜLLER VE BEYNE ÖZGÜ İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM OLARAK UYGULAMALARI

SOLID LIPID NANOPARTICLES AND APPLICATIONS AS BRAIN SPECIFIC DRUG DELIVERY SYSTEMS

Mahmut Ozan TOKSOY^{1,*} , Fahriye Figen TIRNAKSIZ² 

¹Dicle Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 21280, Diyarbakır, Türkiye

²Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 06330, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Son 20 yılda nanoteknolojik gelişmeler ile birlikte ilaç moleküllerinin beyne hedeflenmesine yönelik çalışmalarda artış gözlenmektedir. Beyin, kan dolaşımından kendine özgü bir bariyer ile ayrılmıştır. Kan-beyin bariyeri olarak adlandırılan bu yapı astrosit, perisit, endotel hücreleri ve bunlar arasında bulunan sıkı bağlantılardan oluşmaktadır. Moleküllerin beyne geçişini engelleyen enzimatik aktivitenin yanında, beyin sistemik dolaşımdan kan-beyin bariyeri ile ayrılması, terapötik moleküllerinin beyne geçişini olumsuz etkilemektedir. Bu yüzden merkezi sinir sistemi rahatsızlıklarında tedavi zorlaşmakta, terapötik etki azalmakta veya gözlenmemektedir. Bu durumu anlamak ve olası sorunları giderebilmek için beynin ve kan-beyin bariyerinin yapısı bilinmeli, ilaç moleküllerinin geçiş mekanizmaları aydınlatılmalıdır. Beyne hedeflemede ilaç taşıyıcı sistemlerin önemi günden güne artmaktadır. Üretilen sistemler arasında katı lipit nanopartiküllerin kolay üretimi, biyo-uyumluluğu, biyo-bozunabilirliği açısından diğer sistemlere göre avantajları bulunmaktadır. Bu derlemede, kan beyin bariyerinden bahsedilmesi, beyne ilaç hedefleme yöntemlerinin açıklanması ve beyne ilaç moleküllerinin hedeflenmesinde katı lipit nanopartiküllerle yapılan çalışmalardan söz edilmesi amaçlanmıştır.

Sonuç ve Tartışma: İlaç moleküllerinin beyne hedeflenmesinde kan-beyin bariyeri en büyük engeldir. Bu engeli aşabilmek amacıyla geliştirilen sistemlerden biri de katı lipit nanopartiküller olmuş, sayısız çalışmalarla etkinliği kanıtlanmıştır. Hedefleme ile merkezi sinir sistemi rahatsızlıklarında ilaçların etkinliğinin artırılabilceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Beyne hedefleme, ilaç taşıyıcı sistemler, kan-beyin bariyeri, katı lipit nanopartiküller

ABSTRACT

Objective: In the last 20 years, with the nanotechnological developments, there has been an increase in studies aimed at targeting drug molecules to the brain. The brain is separated from bloodstream by a unique

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Mahmut Ozan Toksoy
e-posta / e-mail: mahmutozantoksoy@gmail.com, Tel. / Phone: +905300972714

barrier. This structure, called the blood-brain barrier, which consists of astrocytes, pericytes, endothelial cells and tight junctions between them. Apart from the enzymatic activity that prevents the passage of molecules to the brain, the separation of the brain from the systemic blood circulation by the blood-brain barrier negatively affects the passage of therapeutic molecules. The structure of the brain and the blood-brain barrier must be known and the penetration mechanisms of drug molecules to the brain must be elucidated. In this review, we aimed to mention the blood-brain barrier and drug targeting methods to the brain. Also, importance of the solid lipid nanoparticles in targeting drug molecules to the brain will be emphasized.

Result and Discussion: *Blood-brain barrier is the biggest obstacle in targeting drug molecules to the brain. One of the systems developed to overcome this obstacle is solid lipid nanoparticles. It has been observed that the effectiveness of drugs in central nervous system disorders can be increased by targeting.*

Keywords: *Blood-brain barrier, drug delivery systems, solid lipid nanoparticles, targeting to the brain*

GİRİŞ

Nanoteknolojik gelişmeler, eczacılık alanında ilaçların kontrollü salımı ve istenen bölgeye hedeflendirilmesi açısından son yıllarda büyük gelişmeler göstermiştir. Tedavide başlıca amaçlardan biri olan hedefleme ile ilaç molekülünün etkinliği artırılmakta, istenen bölgeye erişildiği için olası yan etkiler azalmakta ve daha etkin tedavi sağlanmaktadır [1].

Dünya ilaç pazarına bakıldığında, merkezi sinir sistemi hastalıkları için üretilen ilaçlarda 2019 yılı itibarı ile 86 milyar dolarlık harcama gözlenmiştir. Bu durum 2020’ de Covid-19 pandemisi nedeniyle azalsa da, 2021’ de 101 milyar dolar, 2022’ de ise 131 milyar dolar olacağı tahmin edilmektedir [2].

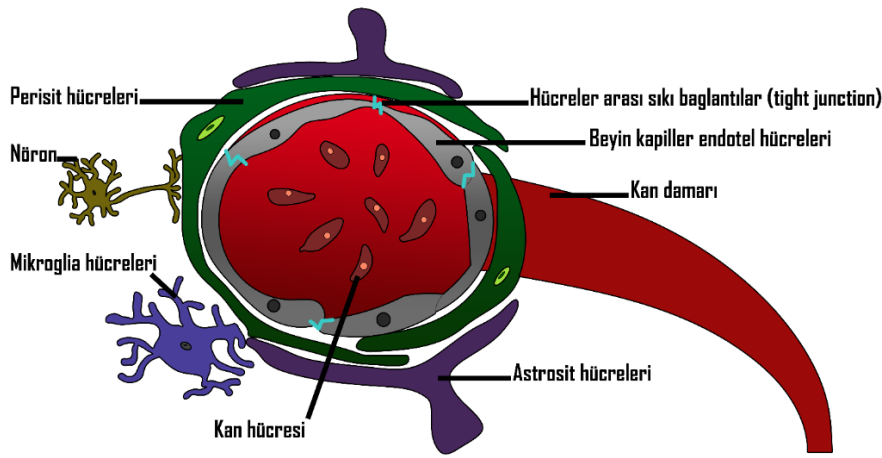
Merkezi sinir sistemi rahatsızlıklarında ilaç moleküllerinin beyne geçişi büyük önem arz eder. Ancak bu durum, kan-beyin bariyerinden ötürü oldukça zordur. Bu bariyerin yapısından ve anatomik özelliklerinden dolayı ilaç moleküllerinin beyne geçişi büyük çoğunlukla engellenmektedir. Bu engeli aşabilmek adına birçok çalışma yapılmış ve farklı özelliklerde ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir [3]. Beyinde terapötik doza ulaşabilmek adına geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemlerinin bir takım özellikleri olması gerekmektedir. Bu özelliklerden bazıları yüksek ilaç yükleme kapasitesi ile küçük partikül büyüklüğüne sahip stabil ve biyo-uyumlu olmalarıdır.

Katı lipit nanopartiküller, lipozom, emülsiyon ve polimerik nanopartiküllere alternatif olarak geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemlerden biridir. Katı yağın emülsiyondaki sıvı yağa göre avantajı, kontrollü salım sağlayabilmesidir. Ayrıca katı yağdan ötürü sistemin stabilitesi yüksektir. Katı lipit nanopartiküllerin boyutu 10-1000 nm arasında değişiklik gösterir. Yapılarında bulunan maddeler biyo-uyumlu ve biyo-bozunabilir [4]. Kısaca katı lipit nanopartiküller, ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmak ve istenilen bölgeye hedeflendirilmek açısından büyük bir potansiyel taşımaktadır. Bu derlemede beynin yapısından, kan-beyin bariyerinden ve beyne ilaç hedeflenmesinde kullanılan yöntemlerden bahsedilmiş; katı lipit nanopartiküllerin üretim yöntemleri ve beyne hedeflendirilmesi hakkında bilgiler verilmiştir.

Kan-Beyin Bariyeri

Beyin, vücut fonksiyonlarını ve faaliyetlerini kontrol eden organdır. Vücuttan izole halde bulunan beyin, sistemik kan dolaşımından bir bariyer ile ayrılmıştır. Kan-beyin bariyeri olarak adlandırılan bu yapı, birçok molekülün sistemik dolaşımdan beyne geçişini engellemektedir. İstenmeyen kimyasallar yanında terapötik maddelerin de geçişi oldukça zordur. Bu sebeple merkezi sinir sistemi rahatsızlıklarında tedavi zorlaşmaktadır [5].

Sistemik kan dolaşımı ile beyin arasındaki bu bariyeri oluşturan hücreler, vücutta bulunan diğer hücrelerden farklı olarak aralarında boşluk olmayacak şekilde çok sıkı dizilmişlerdir. Bu hücreler astrosit, perisit, endotel hücrelerinden ve bu hücreler arasında bulunan sıkı bağlardan oluşmaktadır [6].



Şekil 1. Kan-beyin bariyerinin şematik gösterimi

Kan-beyin bariyerinin, hidrofilik ilaç moleküllerinin beyne geçişini büyük oranda engellediği bilinmektedir. Lipofilik ilaçlarda ise bu durum farklıdır. Uygun molekül ağırlığına (<500 dalton) sahip, uygun partiyon katsayısına ($\log P = 2 - 2,5$) sahip, hidrojen bağ sayısı 8 – 10 arasında olan lipofilik moleküllerin beyne geçişi kolaydır. Bu olay, Lipinski' nin 5 kuralı ile açıklanmaktadır [7].

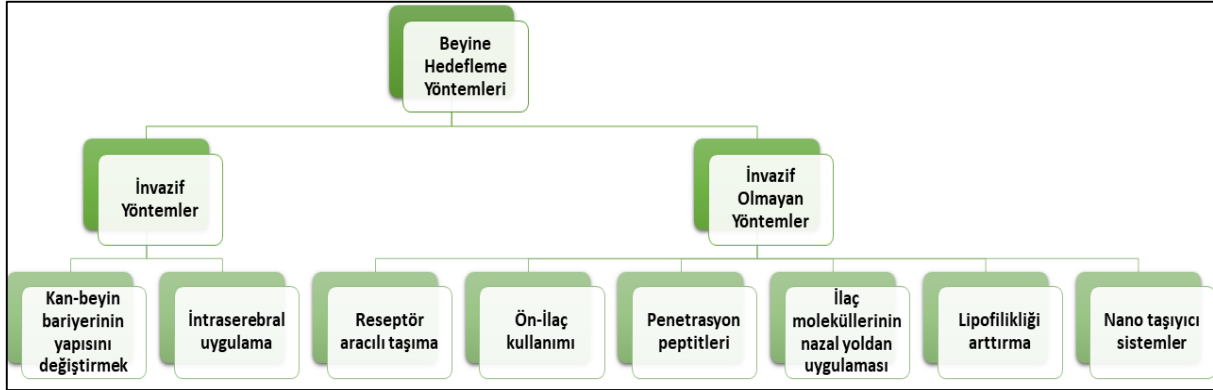
Kan-beyin bariyerinde bulunan hücrelerde iyonik permeabiliteyi etkileyen transendotel elektrik direncinin $1000-5000 \Omega \text{ cm}^2$, vücudun diğer bölgelerinde bulunan hücrelerde ise $10 \Omega \text{ cm}^2$ olduğu bilinmektedir [8]. Yaklaşık 500 katlık bu fark, ilaç moleküllerinin beyne geçişini neredeyse imkânsız hale getirmektedir [9].

Kan-beyin bariyerinde farklı enzimler ve taşıyıcı proteinler de bulunmaktadır. Bunlardan bazıları adenilat siklaz, guanilat siklaz, kateşol-o-metil transferaz, P-glikoprotein ve monoamin oksidazdır. Bu enzimler de beyne geçmeye çalışan birçok molekülü engellemektedir [10].

Beyne Hedefleme Yöntemleri

İlaç moleküllerinin sistemik dolaşımdan beyne geçebilmesi pasif difüzyon ve aktif taşıma ile olmaktadır. Küçük molekül boyutu ve yüksek lipofilite gösteren ilaç moleküllerinin difüzyonu kolaydır. Bununla beraber lipofilik özellikte olan moleküller, sistemik dolaşımdan perifer dokulara doğru geçme

eğilimi gösterirler. İlaç moleküllerinin yağıdaki çözünürlükleri, boyutları, üç boyutlu yapıları, beyne geçişinde etkili olan faktörlerdendir [11]. Hidrofilik moleküller ise hücreler arası boşluklardan geçerek beyne ulaşırlar. Ancak kan-beyin bariyerinden ötürü hücreler arası boşluktan geçiş zordur. Burada aktif taşıma devreye girer. Hidrofilik ilaç molekülleri, kan-beyin bariyeri yapısında bulunan insülin, transferrin, melanotransferrin, nikotinik asetilkolin gibi reseptörler aracılığı ile beyne taşınabilmektedir. Ayrıca kan-beyin bariyerinde yer alan ve glukoz, amino asit gibi esansiyel bileşiklerin beyne taşınmasında görev alan taşıyıcılar da aktif taşımada rol oynar [3].



Şekil 2. Beyne hedefleme yöntemleri

İnvazif yöntemler, cerrahi uygulamalar, beyine giden arterlere doğrudan enjeksiyon yapılmasına ve kan-beyin bariyerinin geri dönüşümlü bozulmasına dayanmaktadır. Ancak bu uygulama, terapötik moleküllerin yanında, istenmeyen toksik moleküllerin de beyne geçişini arttırabileceğinden risklidir. İnvazif olmayan yöntemler ise terapötik molekülün bir taşıyıcı sistem içinde, moleküle veya molekülü içeren taşıyıcı sisteme eklenen bir yapı ile veya molekülün, biyolojik bir yolak vasıtasıyla beyne hedeflendirilmesine dayanır. İnvazif olmayan yöntemler, daha güvenilir olmakla birlikte daha fazla tercih edilmektedir [12].

Kan-beyin bariyerinin yapısını değiştirmek

Bu yöntemde hiperosmolar özellikte bir madde, karotis artere enjekte edilir ve endotel hücrelerden dışarı yönde sıvı çıkışının olması sağlanır. Bu sayede yapıları geçici olarak bozulan hücrelerin, ilaç moleküllerine geçirgenliği arttırılır [13].

Başka bir yol ise mikro kabarcık yöntemidir. Bu yöntemde hücreler arası sıkı bağlantılar, geri dönüşümlü olacak şekilde etkisizleştirilir ve ilaç moleküllerinin geçişi, oluşan bu boşluklardan sağlanmış olur [14].

Her iki yöntem de incelendiğinde, kan-beyin bariyer yapısının değiştirilmesinden kaynaklanabilecek risklerin çok fazla olduğu görülmektedir. İlaç moleküllerinin beyne geçişinin sağlanmasının yanında toksik maddeler, kimyasallar, plazma proteinleri ve bazı zararlı

mikroorganizmaların da geçişi gerçekleşebilmekte ve kalıcı hasar verme riskinde artış olabilmektedir [15].

Intraserebral uygulama

Bu yöntem, beyne ya da beyin omurilik sıvısına doğrudan ilaç uygulanması ile kan-beyin bariyerinin aşılmasına dayanan uygulamadır. Bu yöntemde kanama, iltihap, ödem, nörotoksisite gibi riskler bulunmaktadır [16].

Reseptör aracılı taşıma

Kan-beyin bariyerinde transferrin, leptin gibi peptitlere özgü bir takım reseptörler bulunmaktadır. Bu reseptörler, ilgili molekülleri bağlar ve moleküllerin beyne geçişine yardım eder. Bu aşamada beyne geçen madde miktarı, reseptörün taşıma kapasitesi ile doğru orantılıdır [17].

Ön ilaç kullanımı

Farmakolojik olarak aktif olmayan veya çok az aktif olup, uygulandıktan sonra vücutta aktif hale dönüşen ilaç molekülleridir. Bu uygulama ile ilaç moleküllerinin permeabilitesi arttırılmakta, çözünürlükleri değiştirilmekte ve böylece kan-beyin bariyerinin aşılması sağlanmaktadır [18].

Penetrasyon peptitleri

Penetratin, transportan gibi pozitif yüklü peptitler aynı zamanda hücre delici peptitler olarak da adlandırılmaktadır. Hücrelerin negatif yüklü olması sebebiyle bu peptitler, hedef hücreler ile etkileşime girip bu hücreleri delmekte ve oluşan boşluklardan ilaç molekülleri beyne geçmektedir. Ancak kan dolaşımında bulunan bir takım zararlı maddeler, bileşikler ve kimyasallar da aynı yoldan beyne geçip kalıcı hasara yol açabilmektedir [19].

İlaç moleküllerinin nazal yoldan uygulanması

İnvazif olmayan bir yöntem olan ilaç moleküllerinin nazal uygulanması, son yıllarda gittikçe popüler olmaktadır. Özellikle merkezi sinir sistemi etkili ilaç formülasyonları nazal yoldan uygulandığında biyoyararlanımlarında artışı olmakta ve hastalığın tedavisi sağlanmaktadır [20].

Burun vestibüler, respiratori ve trigeminal bölgelerden oluşmaktadır. Nazal yoldan uygulanan ilaç molekülü, respiratori bölgeden ve yine bu bölgede bulunan damarlanmanın en fazla olduğu olfaktori bölgeden kan dolaşımına veya doğrudan beyne geçebilmektedir. Burada aşılması gereken engel, ilaç moleküllerinin burunda kalış süreleridir [21].

Lipofilikliğin arttırılması

Hücrelerin lipit yapısı göz önünde bulundurularak hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemlerin lipofilikliği, ilaç moleküllerinin beyne geçişinde önemli rol oynamaktadır. Öte yandan artan lipofilikliğe bağlı ilaç moleküllerinin permeabilitesinin artmasının yanında, oksidatif metabolizmanın da artışı ve buna bağlı karaciğer ilk geçiş etkisinde artış gözlenmektedir. Bu yüzden biyoyararlanım artışı sağlamak amacı ile yapılan lipofilikleştirme işleminde, karaciğer ilk geçiş etkisinden kurtulmak zorunludur [22].

Nano boyutlu taşıyıcı sistemler

Son yıllarda sıklıkla kullanılan hedefleme yöntemlerinden biri de nano boyuttaki ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılmasıdır. Genellikle doğal ve biyo-bozunabilir polimerler kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin boyutları 10-1000 nm arasında değişmektedir. Nano ilaç taşıyıcı sistemlere yüklenen ya da bağlanan ilaç moleküllerinin endositoz ya da transitoz geçiş ile beyne hedeflenmesi mümkündür. Bu sistemler arasında lipozomlar, dendrimerler, nanojeller, miseller, polimerik nanopartiküller ve katı lipit nanopartiküller bulunmaktadır [23].

İlaç moleküllerinin beyne hedeflendirilmesinde kullanılan yöntemlere ait çalışmalardan bazıları Tablo 1’ de gösterilmiştir.

Tablo 1. Beyne hedeflemede kullanılan etkin maddeler ve veriliş yollarından bazıları

Etkin Madde	Taşıyıcı Sistem	Veriliş Yolu	Kaynak
Karboplatin	İntraserebral implant	İntrakranial	[24]
Karmustin	İntraserevral uygulama	İntratumör	[25]
Ketoprofen	Ön ilaç	İntrajuguler	[26]
Naproksen	Ön ilaç	Oral	[27]
Sobetrom	Ön ilaç	İntraperitoneal	[28]
Estradiol	Nanopartikül	Oral	[29]
Temozolomid	Nanopartikül	İntravenöz	[30]
Kuersetin	Lipozom	İntranazal	[31]
Dosetaksel	Katı lipit nanopartikül	İntranazal	[32]
Risperidon	Nanoemülsiyon	İntranazal	[33]
Zidovudin	Isıya duyarlı jel	İntranazal	[34]

Katı Lipit Nanopartiküller

Katı lipit nanopartiküller, emülsiyon ve lipozomlara alternatif olarak üretilmişlerdir. Yapılarında, oda sıcaklığı ve vücut sıcaklığında katı halde bulunan yağ/lar bulunmaktadır. Parenteral, oral, nazal veya topikal olarak uygulanabilmektedir. Katı lipit nanopartiküllerin düşük sistemik toksisite göstermeleri, kontrollü salım yapabilmeleri, biyo-bozunur ve biyo-uyumlu olmaları, hem hidrofilik hem lipofilik etkin maddelerin yüklenebilmesi, etki istenen yere hedeflendirilebilmeleri gibi avantajları bulunmaktadır. Kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerden biri olan katı lipit nanopartiküllerin boyutu 10-1000 nm arasında değişiklik göstermektedir [35].

Son yıllarda yeni nesil katı lipit nanopartiküller geliştirilmiş olup nano lipit taşıyıcı sistemler (NLC) ve lipit-ilaç konjugatları (LDC) olarak adlandırılmaktadırlar. Bu sistemler katı ve sıvı lipitlerin karışımından oluşmaktadır. Katı lipit nanopartiküllerin özelliklerinin yanında daha yüksek oranlarda etkin madde yükleme kapasitesine sahiptirler [36]. Farklı yöntemlerle üretilebilirler.

Emülsifikasyon-çözücü uçurma yöntemi

Organik çözücüde lipit çözündürülür ve yüzey etkin maddenin sulu çözeltisi ile karıştırılır. Organik fazın buharlaştırılmasından sonra katı lipit nanopartiküller elde edilir. Bu yöntemde ısı kullanılmadığından ısıdan etkilenebilen etkin maddelerin stabilitesi korunur [37].

Çifte emülsiyon yöntemi

Etkin madde ve yüzey etkin madde su fazında çözündürülür. Bu karışım katı yağı içeren organik faza eklenir. Böylece su/yağ (S/Y) tipi emülsiyon elde edilir. Bu emülsiyon başka bir sulu faza eklenerek su/yağ/su (S/Y/S) tipi emülsiyon oluşturulur. Organik faz buharlaştırılır ve katı lipit nanopartiküller elde edilir. Genellikle hidrofilitik karakterdeki etkin maddelerle çalışılırken bu yöntem uygundur [38].

Çözücü enjeksiyon yöntemi

Yağ fazı, su ile karışabilen bir çözücüde çözündürülür. Karışım lipitin erime derecesinin üzerinde ısıtılır. Bir iğne yardımı ile su fazına damla damla eklenir. Lipit damlalar katılaşır ve nano boyutta tanecikler elde edilir [39].

Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi

Bu yöntem sıcak homojenizasyon ve soğuk homojenizasyon olmak üzere 2' ye ayrılır. Sıcak homojenizasyonda lipitler erime derecesinin üzerinde ısıtılır. Bu eriyikte etkin madde çözündürülür. Bu faz, yağ fazı olarak adlandırılır. Yüzey etkin maddenin sulu çözeltisi, su fazı olarak adlandırılır ve yağ fazı ile aynı sıcaklığa getirilir. İki faz birbiri ile karıştırılır ve yağ/su (Y/S) tipi bir emülsiyon oluşur. Bu emülsiyon yüksek basınçta dar bir alandan geçirilir. Bu işlem, istenen partikül büyüklüğü elde edilene kadar tekrarlanır. Yağ damlacıklarının boyutları küçülür ve katılaşarak katı lipit nanopartiküller elde edilir [40]. Soğuk homojenizasyon tekniği, sıcak homojenizasyon tekniğiyle benzer olup, hazırlanan sıcak haldeki Y/S tipindeki emülsiyonun hızlıca soğutulduğu bir tekniktir. Uygun bir öğütücü yardımı ile toz hale getirilir ve partikül boyutu küçültülür [41].

Mikroemülsiyon yöntemi

Katı yağ eritilir ve etkin madde bu faza eklenir. Yüzey etkin madde ekli sulu çözelti, erimiş yağ ile aynı sıcaklığa getirilir. İki faz aynı sıcaklıkta birbiri ile karıştırılır ve sıcak mikroemülsiyon elde edilir. Sistem soğumaya bırakılır ve yağ damlacıkları katılaşarak katı lipit nanopartiküller meydana gelir [42].

Farklı yöntemlerle üretilen katı lipit nanopartiküle ait çalışmalardan bazıları, Tablo 2' de özetlenmiştir.

Beyne Hedeflemede Katı Lipit Nanopartiküllerin Kullanımı

Katı lipit nanopartiküllere hidrofilitik ve lipofilitik etkin maddelerin yüklenebilmesi ve bu sistemlerin beyne hedeflendirilebilmesi, merkezi sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde büyük önem taşımaktadır. Özellikle konvansiyonel preparatların istenen terapötik etkiyi gösterememesi ve terapötik

dozun beyinde yeterli miktarda sağlanamaması sebebiyle katı lipit nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılması, bu problemlerin giderilmesini sağlamaktadır.

Tablo 2. Farklı yöntemlerle üretilen katı lipit nanopartikül formülasyonları

Etkin Madde	Üretim Yöntemi	Partikül Boyutu (nm)	Amaç	Kaynak
Diklofenak Sodyum	Emülsifikasyon-Çözücü Uçurma	217,3 – 298,4	Suda çözünen bir etkin maddeyi katı lipit nanopartiküllere yüklemek.	[43]
İnsülin	Çifte Emülsiyon	320 – 360	İnsülinin oral absorpsiyonunu arttırmak.	[44]
İdebendon	Çözücü Enjeksiyon	161,7 – 310,3	Beyne hedefleme, optik nöropatik görme bozukluğu tedavisi.	[45]
Tamoksifen	Yüksek Basıncılı Homojenizasyon	66,2 – 142,7	Oral uygulamaya bağlı antitümör etkinliği gözlemek.	[46]
Triptolid	Mikroemülsiyon	147 – 173	Çözünürlük ve toksisite problemini ortadan kaldırmak.	[47]
Siklosporin-A	Mikroemülsiyon	250 – 290	Barsaklardan emilimi arttırmak.	[48]

Jose ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada [49], beyin tümörlerinde etkili olan resveratrol etkin maddesinin katı lipit nanopartiküllere yüklendiği bir formülasyon hazırlanmıştır. Bu formülasyonda yağ olarak Compritol 888 ATO, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde olarak polivinil alkol ve tween 80 kullanılmıştır. Katı lipit nanopartiküller çözücü uçurma, yüksek basınçta homojenizasyon ve ultrasonikasyon teknikleri bir arada kullanılarak hazırlanmış ve 248,3 nm boyutunda resveratrol yüklü katı lipit partiküller elde edilmiştir. İntraperitoneal enjeksiyon yolu ile farelere uygulanan formülasyonlar sonucunda, katı lipitlere yüklü resveratrolün, serbest haldeki resveratrole göre beyne geçişinin yaklaşık 6 kat daha fazla olduğu kanıtlanmıştır.

Graverini ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada [50], diterpenoid bir madde olan andrografolit yüklü katı lipit nanopartiküller hazırlanmıştır. Yağ olarak Compritol 888 ATO, yüzey etkin madde olarak Brij 78 kullanılmıştır. Katı lipit nanopartiküller hazırlanırken çözücü uçurma yöntemi modifiye edilerek kullanılmış ve 278 nm boyutunda andrografolit yüklü katı lipit partiküller elde edilmiştir. İntravenöz enjeksiyonla farelere verilen andrografolit yüklü katı lipit nanopartiküllerin, serbest andrografolite göre 3 kat daha fazla beyne geçtiği saptanmıştır.

Akbaba ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada [51], siRNA yüklü katı lipit nanopartiküllerin, halka yapıda ve 9 aminoasitten oluşan bir peptit olan iRGD (Sırası: CRGDKGPDC) ile konjugatı, beyin tümöründe kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Radyasyon ile birlikte uygulanan katı lipit nanopartiküllerin, tümör tarafından alındığı belirlenmiş ve hedefleme gerçekleştirilmiştir.

Youssef ve arkadaşları [52], migren tedavisinde kullanılmak üzere nazal yoldan uygulanacak almotriptan malat yüklü katı lipit nanopartikül hazırlamışlardır. Çifte emülsiyon ve çözücü uçurma yöntemlerinin birlikte kullanılmasıyla 207,9 nm boyutunda katı lipit nanopartiküller elde edilmiştir. Mukoadesif bir jel sistemine eklenerek nazal uygulanan almotriptan malat yüklü katı lipit nanopartiküllerin, intravenöz uygulanan serbest almotriptan malata göre 3 kat, katı lipit nanopartikül

içermeyip jel sistemine yüklenen almotriptan malata göre yaklaşık 4,5 kat daha fazla beyinde bulunduğu gözlenmiştir.

Singh ve arkadaşları [53], laktoferin konjuge dosetaksel katı lipit nanopartikülleri, emülsifikasyon ve çözücü uçurma yöntemi ile hazırlamışlardır. Katı lipit nanopartiküller hazırlanırken yağ olarak gliseril monostearat ve stearik asit, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde olarak da soya lesitini ve Tween 80 kullanılmıştır. 121 nm boyutunda laktoferin konjuge dosetaksel yüklü katı lipit nanopartiküller elde edilmiştir. Farelere intravenöz uygulanarak piyasa preparatı ile kıyaslanmış ve beyne hedeflenmesi gerçekleştirilmiştir.

Dal Magro ve arkadaşları [54], apolipoprotein-e konjuge katı lipit nanopartikül formülasyonu hazırlamışlardır. Katı lipit nanopartiküller hazırlanırken mikroemülsiyon yöntemi kullanılmış olup yağ olarak Dynasan 116, yüzey etkin madde olarak Epikuron 200 kullanılmış ve radyoaktif olarak işaretlenmiştir. İntraperitoneal, intravenöz ve intratrakeal olarak farelere enjekte edilen bu formülasyonlar incelenmiş ve intravenöz ve intratrakeal uygulanan formülasyonların beyne hedeflenmesi gerçekleşmiştir.

Fatouh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [55], agomelatin yüklü katı lipit nanopartiküller emülsifikasyon/çözücü uçurma tekniğiyle hazırlanmıştır. Yağ olarak Gelucire 43/01, gliseril tripalmitat, gliseril tristearat, stearik asit, Precirol ve Geleol denenmiştir. Yüzey etkin madde olarak polivinil alkol kullanılmıştır. Tam faktöriyel tasarım kullanılarak belirlenen katı lipit nanopartikül formülasyonunda yağ olarak gliseril tripalmitat kullanılmasına karar verilmiş, 253,6 nm boyutunda katı lipit nanopartiküller elde edilmiştir. Piyasa preparatı ile yapılan karşılaştırmalar sonucunda, nazal uygulanan katı lipit nanopartiküllerin beyne geçtiği belirlenmiş ve agomelatin etkin maddesinin beyindeki miktarı, piyasa preparatına göre yaklaşık 4 kat daha fazla bulunmuştur.

Hady ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [56], nazal yoldan uygulanarak beyne hedeflemek üzere levofloksasin ve doksisisiklin yüklü katı lipit nanopartiküller hazırlanmıştır. Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak hazırlanan katı lipit nanopartiküllerde yağ olarak Compritol 888 ATO ve stearik asit karışımı ile yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde olarak da Span 60 ve Pluronic F127 kullanılmıştır. Sıcak homojenizasyon ve ultrasonikasyon yöntemlerinin birlikte kullanılmasıyla 14,46-53,32 nm boyutlarında katı lipit nanopartiküller elde edilmiştir. Levofloksasin ve doksisisiklinin bir jel içindeki formülasyonu ile hazırlanan katı lipit nanopartikül formülasyonları nazal uygulanarak kıyaslanmış ve katı lipit nanopartiküllerin yaklaşık 2 kat daha fazla beyne geçtiği belirlenmiştir.

Etkin madde yüklü katı lipit nanopartiküllerin beyne hedeflenmesi amacıyla yapılan çalışmalardan bazıları da Tablo 3' de verilmiştir.

Tablo 3. İlaç moleküllerinin beyne hedeflenmesi amacıyla hazırlanan katı lipid nanopartiküller

Etkin Madde	Hazırlama Yöntemi	Partikül Boyutu (nm)	Uygulama Yolu	Kaynak
Buspiron	Çözücü Uçurma	218,6 ± 9,18	İntravenöz, İntranazal	[57]
Floksirüdin	Yüksek Basıncılı Homojenizasyon, Ultrasonikasyon	76	İntravenöz	[58]
Pralidoksim klorür	Çifte Emülsiyon	80 ± 4	İntravenöz	[59]
Kamptotesin	Yüksek Basıncılı Homojenizasyon	196,8 ± 21,3	İntravenöz	[60]
Kriptolepin	Çözücü Uçurma	152,4 ± 16,3	İntraperitoneal	[61]
Narkotin	Mikroemülsiyon	80,5 ± 8,9	İntravenöz	[62]
RizatRIPTAN	Çözücü Uçurma	145 – 298	İntranazal	[63]

SONUÇ VE TARTIŞMA

Merkezi sinir sistemi hastalıklarının çoğunun tedavisi olmamakla birlikte amaç, hastanın yaşamını iyileştirmeye yöneliktir. Son yıllarda merkezi sinir sistemi hastalıklarının ilaç pazar payı gittikçe artış göstermekte olup, araştırmacılar bu alana yoğunlaşmıştır. Merkezi sinir sistemi rahatsızlıklarında ilaç moleküllerinin beyne hedeflenmesi, kan-beyin bariyerinden ötürü zor bir süreçtir. Bu derlemede kan-beyin bariyerinin yapısı aydınlatılmaya çalışılmış, beyne ilaç hedefleme yöntemleri açıklanmış, katı lipid nanopartiküllerin önemi belirtilmiştir. Her bir yaklaşım önemlidir ve kendi avantajları/dezavantajları bulunmaktadır. Katı lipid nanopartiküller kolay üretilibilmeleri, etki istenen bölgeye hedeflendirilebilmeleri, biyo-uyumlu ve biyo-bozunur olmalarından dolayı büyük ilgi görmektedir. Bu avantajları, ilaç molekülünden kaynaklanan çözünürlük ve permeabilite problemlerini ortadan kaldırmakla birlikte, merkezi sinir sistemi rahatsızlıklarında kullanımını, konvansiyonel ilaçlara göre özellikle Alzheimer ve Parkinson hastalıklarında ön plana çıkarmaktadır. Bunun yanında yüksek stabilite ve üretimde kolaylık açısından ilaç şirketleri için bulunmaz bir fırsattır. Bu sonuçlar incelendiğinde katı lipid nanopartiküllerin beyne hedeflemede ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmaları, kan-beyin bariyerinin aşılması ve merkezi sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde hastalara faydalı olacaktır.

Araştırmacılar, çalışmalarında ex-vivo ve hücre kültürü deneylerine ek olarak in-vivo testler de yapmalı, katı lipid nanopartiküllerin beyne geçiş etkinliğindeki artışı kanıtlamalıdır. Bu çalışmalar tamamlandığında, hazırlanacak katı lipid nanopartikül formülasyonlarının ilaç pazarında yer almaları muhtemeldir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: *M.O.T., F.F.T.*; Tasarım: -; Denetim: *M.O.T., F.F.T.*; Kaynaklar: -; Malzemeler: -; Veri toplama ve/veya işleme: -; Analiz ve/veya yorumlama: *M.O.T., F.F.T.*; Literatür taraması: *M.O.T., F.F.T.*; Makalenin yazılması: *M.O.T., F.F.T.*; Kritik inceleme: *M.O.T., F.F.T.*; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Agrawal, M., Saraf, S., Saraf, S., Dubey, S. K., Puri, A., Patel, R. J., Alexander, A. (2020). Recent strategies and advances in the fabrication of nano lipid carriers and their application towards brain targeting. *Journal of Controlled Release*, 321, 372-415.
2. Nature Biopharma Dealmakers Web site. (2020). Retrieved December 30, 2020, from <https://www.nature.com/articles/d43747-020-01119-8>.
3. Khan, A. R., Yang, X., Fu, M., Zhai, G. (2018). Recent progress of drug nanoformulations targeting to brain. *Journal of Controlled Release*, 291, 37-64.
4. Mehnert, W., Mäder, K. (2012). Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 83-101.
5. Barnabas, W. (2019). Drug targeting strategies into the brain for treating neurological diseases. *Journal of Neuroscience Methods*, 311, 133-146.
6. Blasi, P., Giovagnoli, S., Schoubben, A., Ricci, M., Rossi, C. (2007). Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(6), 454-477.
7. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 3-25.
8. Lo, E. H., Singhal, A. B., Torchilin, V. P., Abbott, N. J. (2001). Drug delivery to damaged brain. *Brain Research Reviews*. 38, 140-148.
9. Maherally, Z., Fillmore, H. L., Tan, S. L., Tan, S. F., Jassam, S. A., Quack, F. I., Pilkington, G. J. (2018). Real-time acquisition of transendothelial electrical resistance in an all-human, in vitro, 3-dimensional, blood-brain barrier model exemplifies tight-junction integrity. *FASEB Journal*, 32(1), 168-182.
10. Ghersi-Egea, J. F., Leninger-Muller, B., Suleman, G., Siest, G., Minn, A. (1994). Localization of drug-metabolizing enzyme activities to blood-brain interfaces and circumventricular organs. *Journal of Neurochemistry*, 62(3), 1089-1096.
11. Pardridge, W. M. (2002). Drug and gene delivery to the brain: the vascular route. *Neuron*, 36(4), 555-558.

12. Doğan, S., Çaban, S., Çapan, Y. (2013). Beyine İlaç Hedeflendirme Stratejileri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 2, 231-250.
13. Kroll, R. A., Neuwelt, E. A. (1998). Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. *Journal of Neurosurgery*, 42(5), 1083-1099.
14. Choi, J. J., Feshitan, J. A., Baseri, B., Wang, S., Tung, Y. S., Borden, M. A., Konofagou, E. E. (2009). Microbubble-size dependence of focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening in mice in vivo. *Transactions on Biomedical Engineering*, 57(1), 145-154.
15. Bodor, N., Buchwald, P. (2003). Brain-targeted drug delivery. *American Journal of Drug Delivery*, 1(1), 13-26.
16. Harbaugh, R. E., Saunders, R. L., Reeder, R. F. (1988). Use of implantable pumps for central nervous system drug infusions to treat neurological disease. *Journal of Neurosurgery*, 23(6), 693-698.
17. Chan, K. Y., Jang, M. J., Yoo, B. B., Greenbaum, A., Ravi, N., Wu, W. L., Gradinaru, V. (2017). Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nature Neuroscience*, 20(8), 1172-1179.
18. Li, Y., Zhou, Y., Jiang, J., Wang, X., Fu, Y., Gong, T., Zhang, Z. (2015). Mechanism of brain targeting by dexibuprofen prodrugs modified with ethanolamine-related structures. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35(12), 1985-1994.
19. Stalmans, S., Bracke, N., Wynendaele, E., Gevaert, B., Peremans, K., Burvenich, C., De Spiegeleer, B. (2015). Cell-Penetrating Peptides Selectively Cross the Blood-Brain Barrier In Vivo. *PLOS One*, 10(10), e0139652.
20. Pardeshi, C. V., Belgamwar, V. S. (2013). Direct nose to brain drug delivery via integrated nerve pathways bypassing the blood-brain barrier: an excellent platform for brain targeting. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 10(7), 957-972.
21. Gänger, S., Schindowski, K. (2018). Tailoring formulations for intranasal nose-to-brain delivery: A review on architecture, physico-chemical characteristics and mucociliary clearance of the nasal olfactory mucosa. *Journal of Pharmaceutics*, 10(3), 116.
22. Lewis, D. F., Dickins, M. (2002). Substrate SARs in human P450s. *Drug Discovery Today*, 7(17), 918-925.
23. Gao, H. (2016). Progress and perspectives on targeting nanoparticles for brain drug delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(4), 268-286.
24. Olivi, A., Ewend, M. G., Utsuki, T., Tyler, B., Domb, A. J., Brat, D. J., Brem, H. (1996). Interstitial delivery of carboplatin via biodegradable polymers is effective against experimental glioma in the rat. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 39, 90-96.
25. Westphal, M., Hilt, D. C., Bortey, E., Delavault, P., Olivares, R., Warnke, P. C., Ram, Z. (2003). A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-oncology*, 5(2), 79-88.
26. Gynther, M., Jalkanen, A., Lehtonen, M., Forsberg, M., Laine, K., Ropponen, J., Rautio, J. (2010). Brain uptake of ketoprofen-lysine prodrug in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 399(1-2), 121-128.

27. Sheha, M. (2012). Pharmacokinetic and ulcerogenic studies of naproxen prodrugs designed for specific brain delivery. *Archives of Pharmacal Research*, 35(3), 523-530.
28. Meinig, J. M., Ferrara, S. J., Banerji, T., Banerji, T., Sanford-Crane, H. S., Bourdette, D., Scanlan, T. S. (2017). Targeting fatty-acid amide hydrolase with prodrugs for CNS-selective therapy. *ACS Chemical Neuroscience*, 8(11), 2468-2476.
29. Mittal, G., Carswell, H., Brett, R., Currie, S., Kumar, M. R. (2011). Development and evaluation of polymer nanoparticles for oral delivery of estradiol to rat brain in a model of Alzheimer's pathology. *Journal of Controlled Release*, 150(2), 220-228.
30. Tian, X. H., Lin, X. N., Wei, F., Feng, W., Huang, Z. C., Wang, P., Diao, Y. (2011). Enhanced brain targeting of temozolomide in polysorbate-80 coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 445.
31. Priprem, A., Watanatorn, J., Sutthiparinyanont, S., Phachonpai, W., Muchimapura, S. (2008). Anxiety and cognitive effects of quercetin liposomes in rats. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 4(1), 70-78.
32. Singh, I., Swami, R., Pooja, D., Jeengar, M. K., Khan, W., Sistla, R. (2016). Lactoferrin bioconjugated solid lipid nanoparticles: a new drug delivery system for potential brain targeting. *Journal of Drug Targeting*, 24(3), 212-223.
33. Kumar, M., Misra, A., Babbar, A. K., Mishra, A. K., Mishra, P., Pathak, K. (2008). Intranasal nanoemulsion based brain targeting drug delivery system of risperidone. *International Journal of Pharmaceutics*, 358(1-2), 285-291.
34. Ved, P. M., Kim, K. (2011). Poly (ethylene oxide/propylene oxide) copolymer thermo-reversible gelling system for the enhancement of intranasal zidovudine delivery to the brain. *International Journal of Pharmaceutics*, 411(1-2), 1-9.
35. Kaur, I. P., Bhandari, R., Bhandari, S., Kakkar, V. (2008). Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting. *Journal of Controlled Release*, 127(2), 97-109.
36. Gastaldi, L., Battaglia, L., Peira, E., Chirio, D., Muntoni, E., Solazzi, I., Dosio, F. (2014). Solid lipid nanoparticles as vehicles of drugs to the brain: current state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 87(3), 433-444.
37. Pooja, D., Tunki, L., Kulhari, H., Reddy, B. B., Sistla, R. (2016). Optimization of solid lipid nanoparticles prepared by a single emulsification-solvent evaporation method. *Data in Brief*, 6, 15-19.
38. Gallarate, M., Trotta, M., Battaglia, L., Chirio, D. (2009). Preparation of solid lipid nanoparticles from W/O/W emulsions: preliminary studies on insulin encapsulation. *Journal of Microencapsulation*, 26(5), 394-402.
39. Kaushik, M., Mohan, G., Shukla, T. P., Upadhyay, N., Mathur, A., Cherian, B. (2012). Formulation development and evaluation of solid lipid nanoparticles of aceclofenac using solvent injection method. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 2(4), 97-100.
40. Silva, A. C., Gonzalez-Mira, E., Garcia, M. L., Egea, M. A., Fonseca, J., Silva, R., Ferreira, D. (2011). Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): high pressure homogenization versus ultrasound. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 86(1), 158-165.

41. Karami, M. A., Zadeh, B. S. M., Koochak, M., Moghimipur, E. (2016). Superoxide dismutase-loaded solid lipid nanoparticles prepared by cold homogenization method: characterization and permeation study through burned rat skin. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 11, e33968.
42. Cavalli, R., Gasco, M. R., Chetoni, P., Burgalassi, S., Saettone, M. F. (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. *International Journal of Pharmaceutics*, 238(1-2), 241-245.
43. Liu, D., Jiang, S., Shen, H., Qin, S., Liu, J., Zhang, Q., Xu, Q. (2011). Diclofenac sodium-loaded solid lipid nanoparticles prepared by emulsion/solvent evaporation method. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(6), 2375-2386.
44. Sarmiento, B., Martins, S., Ferreira, D., Souto, E. B. (2007). Oral insulin delivery by means of solid lipid nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 2(4), 743.
45. Stancampiano, A. H. S., Acquaviva, R., Campisi, A., Vanella, L., Ventura, C. A., Puglisi, G., Pignatello, R. (2006). Technological and biological characterization of idebenone-loaded solid lipid nanoparticles prepared by a modified solvent injection technique. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2(3-4), 253-270.
46. Al Hajj, N. A., Abdullah, R., Ibrahim, S., Bustamam, A. (2008). Tamoxifen drug loading solid lipid nanoparticles prepared by hot high pressure homogenization techniques. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 3(3), 219-24.
47. Mei, Z., Chen, H., Weng, T., Yang, Y., Yang, X. (2003). Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 56(2), 189-196.
48. Ugazio, E., Cavalli, R., Gasco, M. R. (2002). Incorporation of cyclosporin A in solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics*, 241(2), 341-344.
49. Jose, S., Anju, S. S., Cinu, T. A., Aleykutty, N. A., Thomas, S., Souto, E. B. (2014). In vivo pharmacokinetics and biodistribution of resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles for brain delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 474(1-2), 6-13.
50. Graverini, G., Piazzini, V., Landucci, E., Pantano, D., Nardiello, P., Casamenti, F., Bergonzi, M. C. (2018). Solid lipid nanoparticles for delivery of andrographolide across the blood-brain barrier: in vitro and in vivo evaluation. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 161, 302-313.
51. Erel-Akbaba, G., Carvalho, L. A., Tian, T., Zinter, M., Akbaba, H., Obeid, P. J., Tannous, B. A. (2019). Radiation-Induced Targeted Nanoparticle-Based Gene Delivery for Brain Tumor Therapy. *American Chemical Society Nano*, 13(4), 4028-4040.
52. Abou Youssef, N. A. H., Kassem, A. A., Farid, R. M., Ismail, F. A., Magda Abd Elsamea, E. M., Boraie, N. A. (2018). A novel nasal almotriptan loaded solid lipid nanoparticles in mucoadhesive in situ gel formulation for brain targeting: preparation, characterization and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 548(1), 609-624.
53. Singh, I., Swami, R., Pooja, D., Jeengar, M. K., Khan, W., Sistla, R. (2016). Lactoferrin bioconjugated solid lipid nanoparticles: a new drug delivery system for potential brain targeting. *Journal of Drug Targeting*, 24(3), 212-223.

54. Dal Magro, R., Ornaghi, F., Cambianica, I., Beretta, S., Re, F., Musicanti, C., Sancini, G. (2017). ApoE-modified solid lipid nanoparticles: A feasible strategy to cross the blood-brain barrier. *Journal of Controlled Release*, 249, 103-110.
55. Fatouh, A. M., Elshafeey, A. H., Abdelbary, A. (2017). Intranasal agomelatine solid lipid nanoparticles to enhance brain delivery: formulation, optimization and in vivo pharmacokinetics. *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 1815-1825.
56. Hady, M. A., Sayed, O. M., Akl, M. A. (2020). Brain uptake and accumulation of new levofloxacin-doxycycline combination through the use of solid lipid nanoparticles: Formulation; Optimization and in-vivo evaluation. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 193(2020):111076, 1-12.
57. Mohd, Y., Iti, C., Ameenuzzafar, Z., Madhu V., Noorulla, K. M., Abdurazak, J. T., Nabil, K. A., Misbahu, J. H., Dinesh P., Wondesen, G. G., Debesa, D. D., Sara, U. V. S., Nitin, K. (2020). Buspirone loaded solid lipid nanoparticles for amplification of nose to brain efficacy: Formulation development, optimization by Box-Behnken design, in-vitro characterization and in-vivo biological evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61(2021), 1-13.
58. Jian-Xin, W., Xun, S., Zhi-Rong, Z. (2002). Enhanced brain targeting by synthesis of 3',5'-dioctanoyl-5-fluoro-2'-deoxyuridine and incorporation into solid lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 54(3), 285-290.
59. Daina, N. B., Tatiana, N. P., Irina, V. Z., Evgenia, A. B., Zukhra, M. S., Ildar Kh. R., Vasily, M. B., Konstantin, A. P., Eliana, B. S. (2020). Surface modification of pralidoxime chloride-loaded solid lipid nanoparticles for enhanced brain reactivation of organophosphorus-inhibited AChE: Pharmacokinetics in rat. *Toxicology*, 444, 152578.
60. Shi C. Y., Li F. L., Ying C., Jia, B. Z., Bing, W. L., Chang Z. Y. (1999). Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain. *Journal of Controlled Release*, 59(3), 299-307.
61. Priscilla, K. M., Nana O. A., Paulina, A., Nana, K. K. B., Newman, O. (2021). Solid-lipid nanoparticle formulation improves antiseizure action of cryptolepine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 137, 111354,
62. Jitender, M., Ravi, S. P., Vikas, J., Om, P. K., Ramesh, C., Anju, K. (2013). Poly (ethylene)-glycol conjugated solid lipid nanoparticles of noscapine improve biological half-life, brain delivery and efficacy in glioblastoma cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 9(4), 492-503.
63. Anjita, S., Roshni, U., Pallavi, P., Suman, R. (2015). Preparation and Characterization of Rizatriptan Benzoate Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Brain Targeting. *Materials Today: Proceedings*, 2(9), 4521-4543.



COVID-19 TEDAVİSİNDE İLAÇ-İLAÇ ETKİLEŞİMLERİNİN FARMAKOKİNETİK AÇIDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

PHARMACOKINETIC EVALUATION OF DRUG-DRUG INTERACTIONS IN THE TREATMENT OF COVID-19

Nuran COŞKUN^{1,2} , Özge CEMİLOĞLU ÜLKER^{2,*} 

¹ Doğu Akdeniz Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, 99520, Gazimağusa, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti

² Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı, 06000, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Çin'in Wuhan kentinde başlayan ve tüm dünyayı etkileyen COVID-19 pandemisi, bulaşıcılığı ve ölümcüllüğü benzersiz bir küresel mücadeleyi hala temsil etmektedir. COVID-19 hastalarının semptomları, hastalığın ciddiyetine göre farklılık gösterebilmektedir. Sağlık Bakanlığı Koronavirüs Araştırma Danışma Kurulu, COVID-19'un teşhisi, tedavisi ve kontrolü hakkında yayınladığı rapora göre ilaç kombinasyon tedavisi (hidroksiklorokin, lopinavir / ritonavir ve favipiravir) sağlık yetkilileri tarafından önerilmektedir. Çoğunlukla karaciğerde bulunan sitokrom P 450 enzimleri (CYP) tarafından metabolize edilen bu ilaçların diğer bazı ilaçlarla eş zamanlı kullanımları sonucu ilaç-ilaç etkileşimi olası bir durumdur. Biz bu derlemede COVID-19 tedavisinde kullanılan ilaçların özellikle metabolizma yollarını da belirterek farmakokinetik olarak ilaç-ilaç etkileşimlerini göstermeyi amaçladık.

Sonuç ve Tartışma: COVID-19 pandemisi dünya çapında sosyal hayatı, ekonomik ve finansal piyasaları olumsuz etkilemektedir. Uygun tedavi protokolleri büyük önem taşımaktadır. Ancak tedavi uygulamalarında ilaç-ilaç etkileşimlerinin göz önünde bulundurulması, hasta tedavisinde istenmeyen sonuçların oluşmasına engel olur.

Anahtar Kelimeler: COVID 19, ilaç-ilaç etkileşimleri, farmakokinetik, CYP enzimleri

ABSTRACT

Objective: The COVID-19 pandemic, which started in Wuhan, China and affected the whole world, still represents a unique global challenge with its contagiousness and lethality. The symptoms of COVID-19

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Özge Ülker Cemiloğlu
e-posta / e-mail: ozge.cemiloglu@gmail.com, Tel. / Phone: +90 3122033189

patients may differ depending on the severity of the disease. According to the report published by the Ministry of Health Coronavirus Research Advisory Board on the diagnosis, treatment and control of COVID-19, drug combination therapy (hydroxychloroquine, lopinavir / ritonavir and favipiravir) is recommended by health authorities. Drug-drug interaction is a possible situation as a result of simultaneous use of these drugs, which are metabolized by cytochrome P 450 enzymes (CYP), which are mostly found in the liver, with some other drugs. In this review, we aimed to show the pharmacokinetic drug-drug interactions of the drugs used in the treatment of COVID-19, especially by indicating the metabolism pathways.

Result and Discussion: The COVID-19 pandemic adversely affects social life, economic and financial markets worldwide. Appropriate treatment protocols are of great importance but taking drug-drug interactions into account in treatment practices prevents unwanted results in patient treatment.

Keywords: COVID-19, drug-drug interactions, pharmacokinetic, CYP enzymes

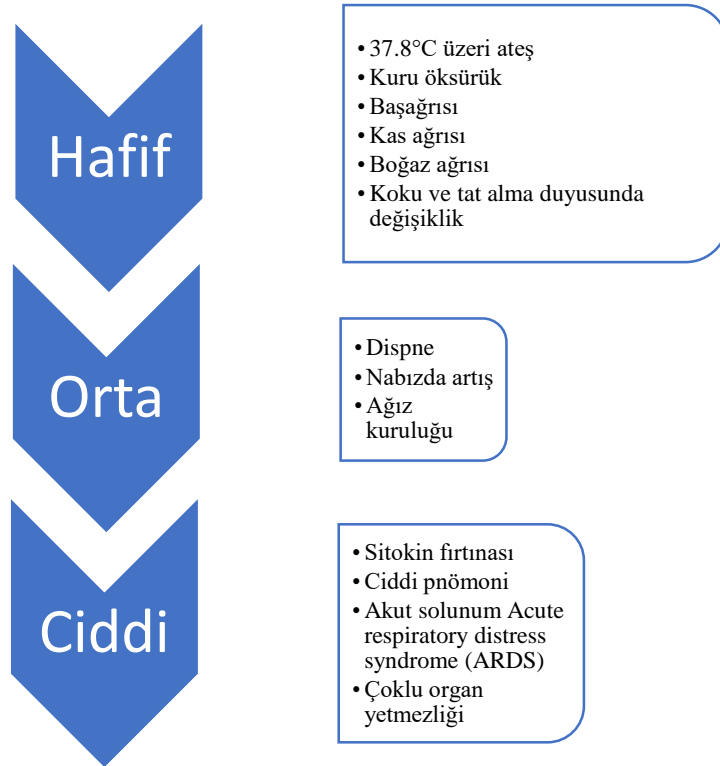
GİRİŞ

Şiddetli akut solunum sendromu-2 (Severe acute respiratory syndrome-2, SARS-CoV-2), koronavirüs hastalığı 2019, COVID-19 pandemisinin orjinal ismidir. Salgın ilk olarak Aralık 2019'da Çin'in Wuhan kentinde tespit edildi ve hızla Çin'in tüm bölgelerine yayıldı. Daha sonra tüm dünyayı etkileyen bir salgına dönüştü ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 11 Mart'ta bu virüse bağlı pandemi ilan etti. Virüs bulaşıcılığı ve ölümcüllüğü nedeni ile benzersiz bir küresel mücadeleyi hala temsil etmektedir [1,2]. Virüsün en erken belirtisi, soğuk algınlığı ve normal mevsimsel grip virüsünün neden olduğu düşünülen şiddetli solunum yetmezliği olarak bildirildi. Daha sonra, artan semptom şiddeti ve enfekte vakaların sayısı nedeniyle, virüs yeni bir koronavirüs olarak tanımlandı ve orijinal olarak 2019-n CoV2 olarak adlandırıldı. SARS-CoV-1 2002'de ve Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüs (MERS-CoV) on yıl sonra 2012'de ortaya çıkmıştır. SARS-CoV-1, MERS-CoV'ye benzer şekilde, SARS-CoV-2 gibi zoonotik kökenli bir virüstür. Farklı bir şekilde SARS-CoV-2, dünya çapında birçok insanı daha hızlı enfekte etmektedir [3,4,5]. Dünya genelinde, 12 Şubat 2021 itibarıyla 2.355.339 ölüm dahil olmak üzere 107.252.265 doğrulanmış COVID-19 vakası DSÖ'ye bildirilmiştir [6]. Türkiye'de 3 Ocak 2020'den 12 Şubat 2021'e kadar, 27.093 ölümlle sonuçlanan 2.556.837 doğrulanmış COVID-19 vakası olmuştur [7].

Virüsün insandan insana doğrudan veya dolaylı temas yoluyla bulaşabileceğini gösteren kanıtlar bulunmaktadır. Öksürmenin ve hapsirmanın solunum virüslerini damlacıklar yoluyla bulaştırabileceği uzun zamandır kabul edilmektedir. Koronavirüs yaklaşık üç saat havada asılı kalabilir ve bu durum hastalığın havadan yayılmasının potansiyel yollarından biridir [8]. İlk kanıtlar, solunan ve virüs taşıyan damlacıkların doğrudan insan solunum sistemine birikebileceğini göstermektedir. Bu virüs, akciğerin alt solunum yollarına derinlemesine nüfuz ettiğinde, tip II pnömositler adı verilen alveolar epitel hücrelerinin yüzeyindeki anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE II) reseptörünü tanır [9].

SARS-CoV-2'nin mekanizmasını anlamak, terapötik hedefleri belirlemeye ve potansiyel bir tedaviyi keşfetmeye yardımcı olabilir. Virüs, hücre zarı füzyonunu takiben, spike proteinini ACE II reseptörüne bağlayarak hücreyi enfekte eder. Virüs, konakçı hücreye girdiğinde, çoğalmasını desteklemek için konakçı hücre mekanizmasını ele geçirir ve yakındaki hücreleri enfekte eder. Koronavirüs vücutta çoğalır ve diğer organların yanı sıra akciğer duvarında daha fazla hasara ve yıkıma neden olur [10].

Vücut, yabancı istilacıya, sırasıyla B hücreleri ve T hücrelerinin aracılık ettiği bağışıklık sisteminin humoral ve hücresele dallarını aktive ederek yanıt vermeye çalışır. B hücreleri, immünoglobulin M (IgM) ve daha sonra immünoglobulin G (IgG) gibi antikorlar üretir. COVID-19 enfeksiyonu durumunda, B hücreleri önce IgM ve ardından 7-14 gün sonra IgG üretir. Doğal öldürücü hücreler, makrofaj ve nötrofiller ayrıca viral saptama ve eliminasyonda yer alan ana hücrelerdir. SARS CoV-2, makrofajları viral enfeksiyona yanıt olarak interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü (TNF) üretimlerini artırmak için uyarır. Proinflamatuvar sitokinlerin üretimi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine yol açabilir. Bu süreç, akut alveolar hasara yol açar [11].



Şekil 1. COVID-19'un belirti ve semptomları

COVID-19'un şiddeti hafif, orta veya ciddi olabilir, semptomlar Şekil 1'de gösterilmektedir.

Çin'de önemli sayıda hastanın (% 81) hafif veya orta şiddette hastalığa sahip olduğu bulunmuştur [12]. Hafif vakalar için, kendi kendine karantina, doktor ve sağlık çalışanları tarafından telefon, e-posta ve video yoluyla düzenli takip genellikle yeterlidir. Öte yandan sigara kullanımı, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, ileri yaş, kardiyovasküler hastalık (örn. kalp yetmezliği, koroner arter hastalığı veya kardiyomiyopati), obezite (vücut kitle indeksi, ≥ 30), kronik böbrek hastalığı, tip 2 diabetes mellitus, organ nakli ve kanser gibi risk faktörlerine sahip hastalar yakından izlenmelidir. Hastalarda dispne gibi kötüleşen semptomlar gelişirse ek değerlendirme gereklidir [13]. Anormal akciğer bulgularının değerlendirilmesi için fizik muayene, akciğer görüntülemesi düşünülmelidir.

COVID-19 vakalarında akciğer bilgisayarlı tomografi (BT) bulguları konsolidasyon ve periferik buzlu cam opasitelerini gösterir. Bu da akciğerin inflamasyon ve sıvıyla dolu olduğu anlamına gelir [14].

COVID-19 hastalarının semptomları, hastalığın ciddiyetine göre farklılık gösterebilmektedir. COVID-19 hastalarının büyük bir kısmı asemptomatik olabilir, ancak virüs bulaşma riski hala yüksektir. Hafif COVID-19 hastalarında kortikosteroid tedavisinin bu hastalarda faydalı olamayabileceği sonucuna varılmıştır [15]. Öte yandan Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri(CDC), enfeksiyonun erken süreci açısından hafif semptomlarda antiviral tedavi önermektedir. Hastalığın sonraki süreci, doku hasarına yol açan virüse abartılı bir bağışıklık / enflamatuvar yanıt tarafından yönlendirilir. Bu süreçlere dayanarak, antiviral tedaviler hastalığın erken dönemlerinde en büyük etkiye sahipken, immünosupresif / anti-enflamatuvar tedaviler hastalığın şiddetli evrelerinde daha yararlıdır [16].

Bugüne kadar, COVID-19 için spesifik bir tedavi oluşturulmamıştır. Sağlık Bakanlığı Koronavirüs Araştırma Danışma Kurulu, COVID-19'un teşhisi, tedavisi ve kontrolü hakkında bir rapor yayınlamıştır. Bu raporda da yer alan ilaç kombinasyon tedavisi (hidroksiklorokin, lopinavir / ritonavir ve favipiravir) sağlık yetkilileri tarafından önerilmektedir. Tüm bu ilaçların klinik olarak farklı birçok potansiyel ilaç-ilaç etkileşimi vardır. Çoğunlukla karaciğerde bulunan CYP3A4 tarafından metabolize edilen bu ilaçların diğer bazı ilaçlarla eş zamanlı kullanımları olasıdır. COVID-19 hastalarında ilaç-ilaç etkileşimlerinin ciddiyeti, farmakokinetik değişikliklerinin yanı sıra ilaç kullanımına bağlı akut böbrek ve karaciğer hasarı da bildirilmiştir [17].

Yaşlı hastalar COVID-19 enfeksiyonu açısından yüksek risk grubundadır ve hastalığın şiddetine bağlı olarak yoğun bakım ünitelerine ihtiyaç duyabilirler. İlaç-ilaç etkileşimi riski, sekiz veya daha fazla ilaç kullanımıyla % 100'e çıkabilmektedir. Bu nedenle, yaşlı hastalar ilaç-ilaç etkileşimleri açısından yüksek risk altındadır. Bu derlemede, özellikle COVID-19 hastalığı tedavisinde kullanılan ilaçların metabolizma yolağı dikkate alınarak etkileşeceği ilaçların araştırılması ve derlenmesi amaçlanmıştır. Sağlık Bakanlığı web sitesinde ilaç ilaç etkileşimleri ile ilgili detaylı bir döküman yayımlanmıştır [18]. Liverpool Üniversitesi İlaç Etkileşimleri Grubu tarafından deneysel COVID-19 tedavisinde kullanılan ilaçların diğer ilaçlarla olan etkileşimleri konusunda hazırlanmış olan tabloların ve bilgilendirme metinlerinin tamamen Türkçeye çevrilmesiyle hazırlanan bu döküman sağlık çalışanlarına rehber olmaktadır. Biz hazırladığımız bu derlemede özellikle COVID-19 tedavisinde kullanılan ilaçların tedavi mekanizmaları ve farmakokinetik ilaç-ilaç etkileşimleri üzerinde durmayı hedefledik.

Klorokin ve hidroksiklorokin

Sıtma, lupus ve romatoid artrit tedavisi için klorokin (CLQ) ve hidroksiklorokin (HCLQ) onaylanmış ilaçlardır. Araştırmalar, bu ilaçların COVID-19 tedavisinde muhtemelen etkili olabileceğini öne sürmüştür. FDA, 27 Mart 2020'de çıkardığı Acil Kullanım İzni ile, bu ilaçların pnömoni kanıtıyla hastanelere kabul edilen COVID-19 hastalarında, kalp ritimlerini izleme koşuluyla kullanılmasına izin vermiştir. HCLQ ve CLQ alkali bileşiklerdir. In vitro çalışmalar, CLQ ve HCLQ'nun lizozom ve endozom pH'sını artırdığını ve SARS-CoV-2 replikasyonunu engellediğini göstermektedir. Bir başka

ilginç bulgu, HCLQ'nun bir çinko iyonofor gibi davrandığını ve böylece çinkonun hücrelere ve lizozomlara akmasına izin verdiğini göstermiştir. HCLQ veya CLQ artı çinko desteğinin COVID-19 morbidite ve mortalitesini azaltmada daha etkili olabileceğine dair bir hipotez vardır. Bununla birlikte, 15 Haziran 2020'de FDA, bu iki ilacın ölüm veya iyileşme süresinde çok az azalma sağladığını ancak uzamış QT aralığı ve ventriküler aritmilerin, kalp ölümüne yol açan "torsades de pointes" e neden olduğunu bildirmiştir. Bu bulgular, devam eden analizlere ve hastanelerde yürütülen büyük, randomize bir klinik araştırmanın en son sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. Bu nedenle, CLQ ve HCLQ'nun riskleri, potansiyel faydalarından artık daha ağır basmaktadır [19].

Tablo 1. Klorokin ve Hidroksiklorokin 'in ilaç etkileşim potansiyeli

Tedavi	Metabolizması ve İlaç etkileşim potansiyeli
Klorokin (CLQ)	<p>CYP2C8, CYP3A4, and CYP2D6 ile metabolize olduğu in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir [20,21]. CYP2D6'yı inhibe eder [21]</p> <p>CYP2D6 ve P-glikoprotein inhibitörü ile birlikte uygulandığında ve bu yollarla dar bir terapötik indeksle metabolize edilen veya taşınan ilaçlarla dikkatli olmak gerekebilir [22].</p> <p>QTc'yi uzattığı gösterilmiştir ve "torsades de pointes"e neden olabilir [23].</p>
Hidroksiklorokin (HCLQ)	<p>CYP2C8, CYP3A4, and CYP2D6 ile metabolize olduğu in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir [21] CYP2D6'yı inhibe eder.[21]</p> <p>Orta dereceli bir CYP2D6 ve P-gp inhibitörü birlikte uygulandığında ve dar bir terapötik indekse sahip olan bu yollarla metabolize edilen veya taşınan ilaçlarla birlikte uygulanması sırasında dikkatli olunması gerekebilir [22].</p> <p>Birlikte kullanımda karbamazepin ve rifampisin gibi indükleyicilerle düşük HCLQ konsantrasyonları gözlemlenebilir [24].</p> <p>Eşzamanlı kullanımda antiasitlerle HCLQ biyoyararlanımının azalması gözlemlenebilir. Bu nedenle, HCLQ alımından 4 saat sonra veya 1-2 saat önce alınmalıdır [24].</p> <p>HCLQ'nun amiodaron, dabigatran, edoksaban ve immünoşpresanlar (siklosporin, sirolimus, takrolimus gibi) ile birlikte kullanıldığında bu ilaçların konsantrasyonlarında artışa neden olur. Bu ilaçların dozunun yeniden ayarlanması, ilaç seviyelerine veya klinik cevaba göre yapılmalıdır [24].</p> <p>HCLQ'nun izoniazid, etambutol veya metronidazol ile birlikte kullanımından sonra, özellikle diyabetik veya yaşlı (60 yaşında) hastalarda periferik nöropati riskinde artışlar gözlemlenebilir [24].</p> <p>HCLQ'nun uzun yarılanma ömrü nedeniyle (yaklaşık bir ay), ilaç-ilaç etkileşimi ve QT uzaması riskleri, ilacın kesilmesi ve hastaneden taburcu olduktan sonra bile gözlemlenebilir. Bu nedenle bu hastaların yakın takibi ve Elektrokardiyografik (EKG) değerlendirmeleri yapılmalı özellikle deksmedetomidin gibi QT uzaması riski taşıyan ilaç kullanan hastalar dikkatle bradikardi riski nedeniyle de takip edilmelidir [24].</p> <p>Azitromisin ve HCLQ ile birlikte uygulanan tedavilerde dikkatli olunmalıdır. Yakın zamanda yapılan bir araştırmanın sonuçları, bu iki ilaç birleştirildiğinde kardiyak ölüm riskinin arttığını göstermektedir [24].</p> <p>HQ ve tiroid hormonları arasında herhangi bir etkileşim bildirilmemiştir [24].</p>

Lopinavir / ritonavir

Lopinavir ve ritonavir kombinasyonu, İnsan İmmün Yetmezlik Virüsünün (HIV) tedavisinde kullanılmaktadır. Lopinavir / ritonavir, proteaz inhibitörleri altında sınıflandırılır. Lopinavir, serumda lopinavir düzeyini artırmaya yardımcı olan güçlü bir CYP3A4 inhibitörü olan ritonavir ile birlikte uygulanan bir antiretroviral ajandır. Bu ilaçların SARS-CoV-2 tedavisinde etkili olabileceğine dair umut

vardı. 4 Temmuz 2020'de DSÖ, hidrosiklorokin ve lopinavir / ritonavirin, hastanede yatan hasta ölümlerinde standart bakım protokollerine kıyasla çok az azalma olduğunu veya hiç azalmadığını duyurmuştur [25]. Lopinavir / ritonavirin yaygın yan etkileri gastrointestinal rahatsızlık ve ishaldir [26].

Tablo 2. Lopinavir / ritonavir kombinasyonunun ilaç etkileşim potansiyeli

Tedavi	Metabolizması ve İlaç etkileşim potansiyeli
Lopinavir / ritonavir (LVP/r) kombinasyonu	<p>Lopinavir / ritonavir kombinasyonu, ilaç etkileşimleri açısından karmaşık bir mekanizmaya sahiptir. Lopinavir, sitokrom p450 (CYP) 3A enzimleri tarafından metabolize edilir.</p> <p>Lopinavir, CYP3A4, CYP2D6 ve P-gp, BCRP ve OATP1B1 gibi bazı önemli taşıyıcıları inhibe eder.</p> <p>Lopinavir / ritonavir kombinasyonu, eşzamanlı kullanımla bazı ilaçların konsantrasyonlarını artırabilir veya azaltabilir. Bu nedenle, dozun yeniden ayarlanması, alternatif ilaç kullanımı veya izleme, etkileşimin klinik önemine dayalı olarak vaka bazında düşünülmelidir. Örneğin, sedatif bir ilaç olan midazolamın yüksek dozlarının veya uzun süreli infüzyonlarının kullanılması hipnotik etkilere, gecikmiş iyileşmeye ve solunum depresyonuna neden olurken, diğer hipnotik sedatif ilaçlar propofol ve fentanil, yalnızca metabolik etkileşim riski taşır [24].</p> <p>COVID-19'da ateşi düzenlemek için kullanılan parasetamol metabolitinin hepatik toksisitesi nedeniyle, diğer lopinavir ile kombine edildiğinde dikkatli olunmalıdır [24].</p> <p>Hidrosiklorokin ve azitromisin ile lopinavir / ritonavir kombinasyon tedavisi sırasında veya makrolidler kinolonlar, antidepresanlar, ondansetron, antiaritmik ajanlar gibi diğer ilaçlarla QT aralığını uzatan antipsikotiklerle QT uzaması riski artabilir. Bu nedenle, elektrokardiyografik (EKG) izleme düşünülmelidir [24].</p> <p>Flutikazon ve budesonid gibi anti-astimatik ilaçlar, CYP3A4'ün aracılık ettiği önemli bir metabolizmaya uğrar. Nazal uygulamadan sonra, ritonavirin plazma maruziyetini 100 kattan fazla artırdığı gösterilmiştir [24].</p> <p>Flutikazon ve ritonavirin birlikte uygulanmasının Cushing sendromuna neden olduğuna dair vaka örnekleri yayınlandığı için birlikte kullanımından kaçınılmalıdır [24].</p> <p>Salmeterolün QT aralığının uzaması ve çarpıntı gibi sistemik etkilerinin gelişme riskinin artması nedeniyle başka bir anti-astimatik ilacı olan salmeterolan ve ritonavirin birlikte uygulanmasından kaçınılmalıdır [24].</p> <p>Antihiperlipidemik ilaçlar arasında pravastatin tercih edilmesi, lopinavir / ritonavir ile tedavi edilen COVID-19 hastalarında önerilmektedir [24].</p>

Favipiravir

Favipiravir, influenza virüsü enfeksiyonlarının tedavisi için Japonya'da onaylanmış geniş spektrumlu bir antiviral ön ilaçtır. Bu ilacın etki mekanizması, seçici olarak RNA polimerazı inhibe etmek ve viral genomun replikasyonunu önlemektir. Favipiravir, remdesivire benzer bir etki mekanizmasına sahiptir, ancak oral yoldan uygulanır. COVID-19 enfeksiyonunun tedavisinde favipiravirin etkinliğini değerlendirmek için dünya çapında klinik çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalar, yüksek favipiravir konsantrasyonlarının viral klirensi kısalttığını ve hafif ila orta vakalarda akciğer bulgularında iyileşme ile sonuçlandığını göstermiştir [27,28,29,30]. Diğer antiviral ilaçlar gibi, favipiravir de kandaki viral yükü azaltmada etkili olmak için semptomların başlangıcından hemen sonra uygulanmalıdır. Bazı hastalarda yan etki olarak ishal, karaciğer toksisitesi ve hiperürisemi bildirilmiştir [31]. Bu nedenle, favipiravirin güvenliği hala araştırılmaktadır.

Remdesivir

Remdesivir, Koronavirüs tedavisi için ABD Gıda ve İlaç İdaresi'nden (FDA) onay alan ilk ilaç oldu. 2009 yılında Hepatit C için olası bir tedavi olarak geliştirilmiş ve 2015 yılında Ebola virüsü için test edilmiştir. Ebola salgını sırasında yeterince etkili bulunamamıştır. Remdesivir bir ön ilaçtır ve adenosin nükleozid analogu olarak bilinen GS-441524 adlı aktif formuna geri döner [33]. Bir literatür taraması, remdesivir ile tedavi edilen hastaların iyileşme süresini kısalttığı ve plasebo grubuna kıyasla alt solunum yolu enfeksiyonunu iyileştirdiği sonucuna varmıştır. Gözlemsel çalışmalar, remdesivir'in hastalığın erken evresinde kullanılması gerektiğini ve tedavinin ilk gün 200 mg intravenöz infüzyonla başlaması gerektiğini, ardından en az dört gün üst üste günde 100 mg infüzyonla başlaması gerektiğini göstermiştir. Entübe edilen hasta için kullanım süresi dokuz günden fazladır [34,35].

Tablo 3. Favipiravirin ilaç etkileşim potansiyeli

Tedavi	Metabolizması/İlaç etkileşim potansiyeli
Favipiravir (FAVI)	Esas olarak aldehit oksidaz (AO) tarafından metabolize edilir. Klinik olarak önemli ilaç etkileşimleri, metabolizma ve klirens dayalı olarak minimum düzeydedir. CYP2C8'i inhibe eder ve bu yollarla metabolize edilen ilaçlarda dikkatli olunması gerekir [32]. Favipiravir ile kombine kullanımda günlük parasetamol dozu 3 g'ı geçmemelidir [24].

Remdesivir'in ciddi olmayan advers etkileri, glomerüler filtrasyon hızında azalma, hemoglobin seviyesinde azalma, lenfosit sayısında azalma, solunum yetmezliği, anemi, hiperglisemi, artmış kan kreatinin seviyesi ve artmış kan glukoz seviyesidir [36].

Tablo 4. Remdesivirin ilaç etkileşim potansiyeli

Tedavi	Metabolizması/İlaç etkileşim potansiyeli
Remdesivir (RDV)	Remdesivir, CYP2C8, CYP2D6 ve CYP3A4 dahil olmak üzere birçok sitokrom P450 enziminin bir substratıdır ve ayrıca organik anyon taşıyan polipeptid OATP1B1 ve P - glikoprotein (P - gp) substratıdır. Ancak, remdesivir metabolizmasının yukarıda belirtildiği gibi CYP enzimleri değil, ağırlıklı olarak hidrolazlar aracılığıyla gerçekleştiği surlmektedir. Hidrolaz aktivitesi ile ağırlıklı olarak metabolize olan bir ön ilaçtır, aktif metaboliti GS-441524'dir [37] IV uygulamasından sonra hızlı dağılım, metabolizma ve klirens dayalı olarak klinik olarak önemli etkileşimler olası değildir [38]. Rifampisin, karbamazepin, fenitoin: [remdesivir] maruziyetinde potansiyel azalma. Bu ilaçlar birlikte uygulanmamalıdır [39]. QTc üzerinde etkisi yoktur.

Sistemik kortikosteroid

Şiddetli COVID-19 pnömonisi olan hastalar sitokin fırtına sendromuna sahip olabilir ve C-reaktif protein, IL-6 gibi inflamatuvar belirteçleri önemli ölçüde artırmıştır. Bunun nedeni viral enfeksiyona yanıt olarak uyarılan makrofajların interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve TNF gibi proinflamatuvar sitokinleri salgılamalarıdır. Enflamatuvar cevabı başlatan proinflamatuvar sitokinlerin üretimi, ROS üretimine yol açabilir ve bu durum enflamasyonun devamına ve şiddetlenmesine neden

olabilir [11]. İşte bu kontrolsüz ve aşırı bağışıklık sistemi tepkileri, akciğer hasarının artmasıyla ilişkili olan sitokin fırtınası adı verilen hiperinflamatuvar bir duruma yol açabilir. Yapılan çalışmaların sonuçları, ciddi şekilde etkilenen hastaların, hafif ila orta şiddette hastalığı olan hastalara göre sitokin fırtına sendromu geliştirme olasılığının daha yüksek olduğunu göstermektedir. Sitokin fırtına sendromunda, kan dolaşımında çok sayıda sitokin salınır. Sitokin fırtınasının, akut solunum sıkıntısı sendromunun (ARDS) ve çoklu organ yetmezliğinin ana nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir [40].

Kortikosteroidlerin güçlü bir antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu iyi bilinmektedir. Geçmişte, steroid uygulaması SARS-CoV ve MERS-CoV hastalarında denenmiş ancak cevap alınamamıştır. Hatta gecikmiş viral klirensini bozduğu ve ikincil enfeksiyon riskini artırdığı ileri sürülmüştür [41].

Haziran 2020'de Oxford Üniversitesi, COVID-19 hastalarında kortikosteroidlerin potansiyel yararlı kullanımını test etmek için randomize bir klinik çalışma yayınlamıştır. Bu klinik çalışmada, hastalar on gün boyunca günde 6 mg deksametazonu oral veya intravenöz olarak almış ve sonuçla kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar, ventilasyon uygulanan hastalarda ölüm oranının üçte bir ve yalnızca oksijen alan hastalarda beşte bir azaldığı sonucuna varmışlardır. Solunum desteğine ihtiyaç duymayan hastalarda fayda görülmemiştir. COVID-19'lu kişilerde kortikosteroidler, teorik olarak inflamatuvar yanıtı modüle edebilir ve ARDS gelişme riskini azaltabilir [42]. Bununla birlikte, şu anda konuyla ilgili sınırlı kanıt vardır ve klinik araştırmalar halen devam etmektedir.

Tablo 5. Deksametazonun ilaç etkileşim potansiyeli

Tedavi	İlaç etkileşim potansiyeli
Deksametazon	In vitro olarak CYP3A4 ile metabolize olduğu ve bu enzimi inhibe edebildiği gösterilmiştir [43]. Nöbet önleyici bir ilaç olan fenitoin kullanan hastalarla deksametazonun eşzamanlı alınmasının, serum fenitoin konsantrasyonlarının artmasına neden olduğu gösterilmiştir [44]. COVID-19 tedavisi sırasında, diyabeti olsun ya da olmasın, deksametazon almaya başlayan tüm hastaların kan glukoz düzeyleri izlenmeli ve hiperglisemi tedavisini almaları sağlanmalıdır [45].

Interlökin inhibitörleri ve Interferon

Sitokin fırtınası, özellikle artan IL-1, IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin aşırı salımları nedeniyle oluşmaktadır. Bu nedenle IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinleri hedeflemenin, inflamatuvar cevabı azaltmaya yardımcı olabileceği ve böylece akut solunum sendromu gibi hastalıkların ciddiyetini azaltabileceği öne sürülmüştür. Tosilizumab, IL-6 reseptörlerine bağlanarak kemokinleri hedefleyen immünoşüpresif bir ilaçtır. İlaç, romatoid artrit ve sitokin salım sendromunun tedavisi için FDA onayına sahiptir [46]. Tosilizumab, COVID-19 ile ilişkili şiddetli solunum semptomları olan hastalar için bir seçenektir.

Tedavinin güvenliğini ve etkinliğini değerlendirmek için birçok klinik çalışma yapılmıştır [47,48,49]. Bununla birlikte, ilaca başlamak için uygun zamana dair hala bir kanıt yoktur. Tosilizumab,

enfeksiyonun erken bir aşamasında uygulanırsa, virüsle savaşmaktan sorumlu bağışıklık sistemini baskılayabilir. Öte yandan, tedavi stratejisi IL-6 hasarlarından önce mümkün olduğunca erken yapılmalıdır. Tosilizumab, üst solunum yolu bakteriyel enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları gibi ciddi enfeksiyon riski taşır ve bu nedenle bakteriyel pnömoni COVID-19 hastaları için önerilmez [50]. IL-6 inhibitörü olan bir diğer ilaç Sarilumab'ın ciddi COVID-19 semptomlu hastalarda kullanımı önerilmektedir [51].

Diğer bir proinflatuvar sitokin olan IL-1 miktarını azaltmak için Anakinra isimli IL-1 inhibitörünün de ciddi COVID-19 hastalarının tedavisinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür. [52,53].

Tip I interferon (özellikle interferon beta-1b), COVID-19 tedavisi için bir tek olarak veya lopinavir / ritonavir ve ribavirin ile kombinasyon halinde önerilmiştir. Bir Faz II randomize çalışmada, bu kombinasyonun nazofaringeal sürüntü negatifleşmesine kadar geçen süreyi (12 günden 7 güne) azalttığı gösterilmiştir [54].

Tablo 6. Interlökin inhibitörleri ve Interferonun ilaç etkileşim potansiyeli

Tedavi	İlaç etkileşme potansiyeli
Tosilizumab (TCZ)	IL-6 inhibitörüdür Anti-Tümör Nekroz Faktörü (Anti-TNF) ajanlarının, Biyolojik Hastalık Modifiye Edici Antiromatizmal İlaçların (DMARDs), kladribin, infliksimab, natalizumab, takrolimusun immünsüpresif etkilerinde artışlar tosilizumab tedavisi sırasında görülebilmektedir. Bu nedenle, tosilizumabın bu ilaçlardan herhangi biriyle kullanımından kaçınılmalıdır [24]. Tosilizumab tedavisi sırasında CYP3A4 substratlarının serum konsantrasyonunda azalma gözlemlenebilir, bu nedenle CYP3A4 ile metabolize olan ilaçların eşzamanlı kullanımında monitör tedavisi gereklidir [24]. QTc üzerinde etkisi yoktur [55].
Sarilumab	IL-6 inhibitörüdür. IL-6, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 ve CYP3A4 seviyelerinin azalmasına neden olur [24].
Anakinra	IL-1 alpha and beta yarışmalı inhibitörleridir. Başlıca metabolize olduğu organ böbreklerdir [24].
Interferon (IFN)	Farmakokinetik ilaç-ilaç etkileşimi potansiyeli, CYP'ler ile sınırlı etkileşimleri nedeniyle düşüktür [54].

SONUÇ VE TARTIŞMA

COVID-19, dünya çapında sosyal hayatı, ekonomik ve finansal piyasaları olumsuz etkileyen bir salgındır. İlaç-ilaç etkileşimleri önemlidir. Hasta tedavisinde istenmeyen sonuçlara neden olur ve ilaçların olumsuz etkilerini tetikler. Ancak takip çalışmaları yaparak bu etkilerin önüne geçmek mümkündür. İlaç-ilaç etkileşimlerinin mekanizmaları, şiddeti, etki şekli ve klinik semptomları hastaya göre farklılaştırılabilir. Bu nedenle tanı, ilaç etkileşiminin yönetimi kadar önemlidir. Klinisyenler, COVID-19 hastalarının tedavisi sırasında bir yeni ilaç yazarken özellikle ilaç-ilaç etkileşimi olasılığını da göz önünde bulundurmalıdır.

Virüs bulaşma riskini en aza indirmek için etkili önleme tedbirleri izlenmelidir. CDC'ye göre kamuya açık ortamlarda tıbbi veya bez yüz maskesi takılması, en az bir metre fiziksel mesafenin korunması, düzenli olarak ellerin yıkanması, ellerin alkol bazlı ürünlerle sürekli dezenfekte edilmesi önemlidir. Gözlere, buruna ve ağza mümkün olduğunca dokunulmamalıdır. Bu basit davranışları izlemek, virüsün yayılmasını sınırlar. Hükümetler, virüsün yayılmasını doğru bir şekilde izlemek için teşhis testi oranını artırmalıdır. İyileşme oranının ölüm oranından daha yüksek olduğu bilinmektedir.

İnsanları COVID-19'a karşı korumak için aşılama adımı çok önemlidir. Çok sayıda insan hala koronavirüse karşı savunmasızdır. Aşılar vücudumuzun koronavirüse yakalanmasını önler, en azından bağışıklık sistemlerimizi enfeksiyonla savaşmaya teşvik eder ve COVID-19'un şiddetli semptomlarında azalmaya neden olur.

Bu derlemede tedavi protokolleri, ilaç-ilaç etkileşimleri COVID-19 ile enfekte hastaların tedavisi açısından tartışılmıştır. Aşılama protokolleri ve COVID-19'a karşı farklı aşı türleri başka bir derlemede tartışılacaktır.

YAZAR KATKILARI

Kavram: Ö.C.Ü.; Tasarım: N.C., Ö.C.Ü.; Denetim: Ö.C.Ü.; Kaynaklar: -; Malzemeler: -; Veri toplama ve/veya işleme: N.C., Ö.C.Ü.; Analiz ve/veya yorumlama: N.C., Ö.C.Ü.; Literatür taraması: N.C., Ö.C.Ü.; Makalenin yazılması: N.C., Ö.C.Ü.; Kritik inceleme: N.C., Ö.C.Ü.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (Erişim tarihi: 04.04.2020). WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020.
2. <https://crofsblogs.typepad.com/h5n1/2019/12/wuhan-municipal-health-commission-announces-pneumonia-epidemic.html> (Erişim Tarihi: 11.02.2020). Wuhan Municipal Health and Health Commission's Briefing on the Current Pneumonia Epidemic Situation in Our City. 2019.
3. Zheng, Y. Y., Ma, Y. T., Zhang, J. Y., Xie, X. (2020). COVID-19 and the cardiovascular system. *Nature Reviews Cardiology*, 17(5), 259-260.
4. Giannis, D., Ziogas, I. A., Gianni, P. (2020). Coagulation disorders in coronavirus infected patients: COVID-19, SARS-CoV-1, MERS-CoV and lessons from the past. *Journal of Clinical Virology*, 127, 104362.

5. [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it) (Erişim Tarihi: 24.02.2020). Naming the Coronavirus Disease (COVID-19) and the virus that causes it.
6. <https://covid19.who.int> (Erişim Tarihi: 12.02.2021)
7. <https://covid19.who.int/region/euro/country/tr> (Erişim Tarihi: 12.02.2021)
8. Dietz, L., Horve, P. F., Coil, D. A., Fretz, M., Eisen, J. A., Van Den Wymelenberg, K. (2020). 2019 novel coronavirus (COVID-19) pandemic: built environment considerations to reduce transmission. *Msystems*, 5(2), 1-13.
9. Sriram, K., Insel, P. A. (2020). A hypothesis for pathobiology and treatment of COVID-19: The centrality of ACE1/ACE2 imbalance. *British journal of pharmacology*, 177(21), 4825-4844.
10. Astuti, I. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 14(4), 407-412.
11. Costela-Ruiz, V. J., Illescas-Montes, R., Puerta-Puerta, J. M., Ruiz, C., Melguizo-Rodríguez, L. (2020). SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. *Cytokine & growth factor reviews*, 54(2020), 62-75.
12. Wu, Z., McGoogan, J. M. (2020). Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *The Journal of the American Medical Association*, 323(13), 1239-1242.
13. Jordan, R. E., Adab, P., Cheng, K. K. (2020). Covid-19: risk factors for severe disease and death, *British Medical Journal*, 368, 1-2.
14. Kalra, M. K., Homayounieh, F., Arru, C., Holmberg, O., Vassileva, J. (2020). Chest CT practice and protocols for COVID-19 from radiation dose management perspective. *European Radiology*, 30, 6554-6520.
15. Ding, C., Feng, X., Chen, Y., Yuan, J., Yi, P., Li, Y., Xu, K. (2020). Effect of corticosteroid therapy on the duration of SARS-CoV-2 clearance in patients with mild COVID-19: A retrospective cohort study. *Infectious diseases and therapy*, 9(4), 943-952.
16. <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/therapeutic-management/> (Erişim Tarihi: 11.02.2021)
17. <https://www.covid19-druginteractions.org/> (Erişim Tarihi: 09.01.2020)
18. <https://khgmstokyonetimidb.saglik.gov.tr/TR-64698/covid--19-tedavisinde-kullanilan-ilaclar---ilac-etkilesimleri.html> (Erişim Tarihi: 06.01.2020)
19. Mehra, M. R., Desai, S. S., Kuy, S., Henry, T. D., Patel, A. N. (2020). Cardiovascular disease, drug therapy, and mortality in Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 382(25), 1-7.
20. Projean, D., Baune, B., Farinotti, R., Flinois, J. P., Beaune, P., Taburet, A. M., Ducharme, J. (2003). In vitro metabolism of chloroquine: identification of CYP2C8, CYP3A4, and CYP2D6 as the main isoforms catalyzing N-desethylchloroquine formation. *Drug Metabolism and Disposition*, 31(6), 748-754.

21. Paniri, A., Hosseini, M. M., Rasoulinejad, A., Akhavan-Niaki, H. (2020). Molecular effects and retinopathy induced by hydroxychloroquine during SARS-CoV-2 therapy: role of CYP450 isoforms and epigenetic modulations. *European Journal of Pharmacology*, 886, 173454.
22. Hodge, C., Marra, F., Marzolini, C., Boyle, A., Gibbons, S., Siccardi, M., Khoo, S. (2020). Drug interactions: a review of the unseen danger of experimental COVID-19 therapies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(12), 3417-3424.
23. O'Horo, J. C. (2020). Chloroquine. *Elsevier*.
24. Lemaitre, F., Solas, C., Grégoire, M., Lagarce, L., Elens, L., Polard, E., French Society of Pharmacology, Therapeutics (SFPT), the International Association of Therapeutic Drug Monitoring, Clinical Toxicology (IATDMCT). (2020). Potential drug–drug interactions associated with drugs currently proposed for COVID-19 treatment in patients receiving other treatments. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 34(5), 530-547.
25. <https://www.who.int/news/item/04-07-2020-who-discontinues-hydroxychloroquine-and-lopinavir-ritonavir-treatment-arms-for-covid-19> (Erişim Tarihi: 06.08.2020)
26. Chandwani, A., Shuter, J. (2008). Lopinavir/ritonavir in the treatment of HIV-1 infection: a review. *Therapeutics and clinical risk management*, 4(5), 1023.
27. Chen, C., Huang, J., Cheng, Z., Wu, J., Chen, S., Zhang, Y., Wang, X. (2020). Favipiravir versus arbidol for COVID-19: a randomized clinical trial. *MedRxiv*.
28. Cai, Q., Yang, M., Liu, D., Chen, J., Shu, D., Xia, J., Liu, L. (2020). Experimental treatment with favipiravir for COVID-19: an open-label control study. *Engineering*, 6(10), 1192-1198.
29. Coomes, E. A., Haghbayan, H. (2020). Favipiravir, an antiviral for COVID-19? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(7), 2013-2014.
30. Doi, Y., Hibino, M., Hase, R., Yamamoto, M., Kasamatsu, Y., Hirose, M., Kondo, M. (2020). A prospective, randomized, open-label trial of early versus late favipiravir therapy in hospitalized patients with COVID-19. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(12).
31. Agrawal, U., Raju, R., Udawadia, Z. F. (2020). Favipiravir: A new and emerging antiviral option in COVID-19. *Medical Journal Armed Forces India*, 76(2020), 370-376.
32. Irie, K., Nakagawa, A., Fujita, H., Tamura, R., Eto, M., Ikesue, H., Hashida, T. (2020). Pharmacokinetics of Favipiravir in critically ill patients with COVID-19. *Clinical and translational science*, 13(5), 880-885.
33. Rubin, D., Chan-Tack, K., Farley, J., Sherwat, A. (2020). FDA approval of remdesivir—a step in the right direction. *New England Journal of Medicine*, 383(27), 2598-2600.
34. Norrie, J. D. (2020). Remdesivir for COVID-19: challenges of underpowered studies. *The Lancet*, 395(10236), 1525-1527.
35. Wang, L. Y., Cui, J. J., Ouyang, Q. Y., Zhan, Y., Guo, C. X., Yin, J. Y. (2020). Remdesivir and COVID-19. *The Lancet*, 396:10256, 953-954.
36. Beigel, J. H., Tomashek, K. M., Dodd, L. E., Mehta, A. K., Zingman, B. S., Kalil, A. C., Lane, H. C. (2020). Remdesivir for the treatment of Covid-19-preliminary report. *The New England journal of medicine*, 383(10), 1-14.

37. Yang, K. (2020). What do we know about remdesivir drug interactions? *Clinical and translational science*, 13(5), 842-844.
38. McCreary, E. K., Pogue, J. M. (2020, April). Coronavirus disease 2019 treatment: a review of early and emerging options. In *Open forum infectious diseases* (Vol. 7, No. 4, p. ofaa105). US: Oxford University Press.
39. <https://www.covid19-druginteractions.org> (Erişim Tarihi: 04.05.2020). Liverpool Drug Interactions Group University of Liverpool. COVID-19 drug interactions.
40. Mehta, P., McAuley, D. F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R. S., Manson, J. J. (2020). COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *The lancet*, 395:10229, 1033-1034.
41. Tang, C., Wang, Y., Lv, H., Guan, Z., Gu, J. (2020). Caution against corticosteroid-based COVID-19 treatment. *The Lancet*, 395:10239, 1759-1760.
42. RECOVERY Collaborative Group. (2020). Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19—preliminary report. *New England Journal of Medicine*, 384(8), 693-704.
43. Kanazu, T., Yamaguchi, Y., Okamura, N., Baba, T., Koike, M. (2004). Model for the drug–drug interaction responsible for CYP3A enzyme inhibition. I: evaluation of cynomolgus monkeys as surrogates for humans. *Xenobiotica*, 34(5), 391-402.
44. Wong, D. D., Longenecker, R. G., Liepman, M., Baker, S., LaVergne, M. (1985). Phenytoin-dexamethasone: a possible drug-drug interaction. *The Journal of the American Medical Association*, 254(15), 2062-2063.
45. Rayman, G. E. R. Y., Lumb, A. N., Kennon, B., Cottrell, C., Nagi, D., Page, E., Stewart, R. (2021). Dexamethasone therapy in COVID-19 patients: implications and guidance for the management of blood glucose in people with and without diabetes. *Diabetic Medicine*, 38(1), e14378.
46. Le, R. Q., Li, L., Yuan, W., Shord, S. S., Nie, L., Habtemariam, B. A., Pazdur, R. (2018). FDA approval summary: tocilizumab for treatment of chimeric antigen receptor T cell-induced severe or life-threatening cytokine release syndrome. *The oncologist*, 23(8), 943.
47. Hermine, O., Mariette, X., Tharaux, P. L., Resche-Rigon, M., Porcher, R., Ravaud, P., Korganow, A. S. (2021). Effect of tocilizumab vs usual care in adults hospitalized with COVID-19 and moderate or severe pneumonia: a randomized clinical trial. *The Journal of the American Medical Association internal medicine*, 181(1), 32-40.
48. Salama, C., Han, J., Yau, L., Reiss, W. G., Kramer, B., Neidhart, J. D., Mohan, S. V. (2021). Tocilizumab in patients hospitalized with Covid-19 pneumonia. *New England Journal of Medicine*, 384(1), 20-30.
49. Salvarani, C., Dolci, G., Massari, M., Merlo, D. F., Cavuto, S., Savoldi, L., Costantini, M. (2021). Effect of tocilizumab vs standard care on clinical worsening in patients hospitalized with COVID-19 pneumonia: a randomized clinical trial. *The Journal of the American Medical Association internal medicine*, 181(1), 24-31.
50. Zhang, S., Li, L., Shen, A., Chen, Y., Qi, Z. (2020). Rational use of tocilizumab in the treatment of novel coronavirus pneumonia. *Clinical drug investigation*, 40(6), 511-518.

51. Lescure, F. X., Honda, H., Fowler, R. A., Lazar, J. S., Shi, G., Wung, P., Hagino, O. (2021). Sarilumab treatment of hospitalised patients with severe or critical COVID-19: a multinational, randomised, adaptive, phase 3, double-blind, placebo-controlled trial. *medRxiv*.
52. Balkhair, A., Al-Zakwani, I., Al Busaidi, M., Al-Khribash, A., Al Mubaihsi, S., BaTaher, H., Balkhair, O. (2021). Anakinra in hospitalized patients with severe COVID-19 pneumonia requiring oxygen therapy: results of a prospective, open-label, interventional study. *International Journal of Infectious Diseases*, 103, 288-296.
53. Pasin, L., Cavalli, G., Navalesi, P., Sella, N., Landoni, G., Yavorovskiy, A. G., Monti, G. (2021). Anakinra for patients with COVID-19: a meta-analysis of non-randomized cohort studies. *European journal of internal medicine*, 86, 34-40.
54. Hung, I. F. N., Lung, K. C., Tso, E. Y. K., Liu, R., Chung, T. W. H., Chu, M. Y., Yuen, K. Y. (2020). Triple combination of interferon beta-1b, lopinavir–ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial. *The Lancet*, 395(10238), 1695-1704.
55. Yuan, J., Li, M., Yu, Y., Lee, T. Y., Lv, G., Han, B., Lu, Z. K. (2021). Pharmacotherapy Management for COVID-19 and Cardiac Safety: A Data Mining Approach for Pharmacovigilance Evidence from the FDA Adverse Event Reporting System (FAERS). *Drugs-Real World Outcomes*, 8(2), 131-140.

Yayım Koşulları

1. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi (Ankara Ecz. Fak. Derg. - J. Fac. Pharm. Ankara) yılda üç kez (Ocak-Mayıs-Eylül) yayımlanır.
2. Dergiye Eczacılığın her alanında daha önce hiçbir yerde yayınlanmamış, Türkçe veya İngilizce olarak hazırlanmış makaleler kabul edilir. Deneylerde, insan için “the Declaration of Helsinki” ve hayvan için “European Community Guidelines”’a bağlı kalınmalıdır.
3. Yayın Komisyonuna gelen makaleler en az 2 danışmana gönderilir.
4. Makaleler yayına kabul ediliş sırasına göre yayınlanır.
5. Danışmanlar tarafından önerilen düzeltmelerin yapılması için yazar/ yazarlara geri gönderilen makaleler, düzeltilip yayınlanmak üzere 3 ay içinde tekrar yayın kuruluna gönderilmezse, yeni başvuru olarak işlem görür. Makale yayımlanmadan önce yazarların yayımcıya makalenin “Copyright Transfer Form”unu doldurarak telif hakkını göndermesi gerekmektedir.
6. Yayınlarında intihal olup olmadığı kontrol edilmelidir.
7. Dergimize aşağıdaki makale türleri kabul edilir:
 - a) **Araştırma makalesi:** Türkçe veya İngilizce hazırlanmış, şekiller ve tablolar dahil tamamı en çok 20 A4 kağıdı sayfası olan, orjinal araştırmaların bulgu ve sonuçlarını açıklayan makalelerdir.
 - b) **Derleme:** Türkçe veya İngilizce hazırlanmış, şekil ve tablolar dahil tamamı en çok 25 A4 kağıdı sayfası olan, yeterli sayıda bilimsel makale taranarak, o güne kadarki gelişmeleri özetleyerek ortaya koyan ve sonuçlarını yorumlayarak değerlendiren makalelerdir.
 - c) **Önbilgiler:** Devam etmekte olan bir çalışmanın bulgularını zaman kaybetmeden duyurmak için Türkçe veya İngilizce yazılan en çok 5 A4 kağıdı sayfası olan makalelerdir.

Yayım Gönderme

Yazarlar makalelerini <https://dergipark.org.tr/tr/pub/jfpanu> adresinden online olarak yükleyeceklerdir.

Yazım Kuralları

1. Metinler, A4 normunda (21 x 29,7 cm) yazılmış olmalıdır.
 2. Bütün tablo ve şekiller metin içindeki yerlerine yazım alanından taşmadan yerleştirilmiş olmalıdır.
 3. Metinler A4 normundaki sayfanın sağ ve sol tarafından 2,5 cm., üst ve alt kenarlarından 3 er cm boşluk bırakılarak (ilk sayfada yukarıdan 5 satır aralığı) 1,5 satır aralıkla yazılmalıdır. Yayımlı kabul edilen makaleler doğrudan “Microsoft Word” dosyası halinde online olarak sisteme yüklenecektir (online submission). Ana metin yazı karakteri “Times New Roman” ve 11 punto olmalıdır.
 4. Sayfa numaraları makalede belirtilmemelidir.
 5. Yazar adı (küçük harf) ve soyadı (büyük harf) koyu olarak başlığın altına üç satır aralık verildikten sonra altına unvan belirtmeden yazılmalıdır. Birden çok yazar varsa virgülle ayrılıp bir boşluk bırakılarak yazılmalıdır. Yazarların soyadları üzerine konulacak rakamlarla hemen isimlerin altındaki satıra kurum adları ve posta adresleri açıkça yazılmalıdır.
 6. Başlık sayfasında yayın adı, yazar/yazarların adları ve yazışma yapılacak yazarın açık adresi, telefon ve faks numaraları, varsa e-mail adresi belirtilmelidir. Sorumlu yazarın soyadının üstüne (*) işareti konularak belirtilmelidir. Bu kişinin açık adresi, faks numarası, telefon numarası ve e-mail adresi başlık sayfasının en altında belirtilmelidir.
 7. Tablolar üstlerine, şekiller (formül, grafik, şema, spektrum, kromatogram, fotoğraf v.b.) de altlarına arabik rakamlarla (**Şekil 1.**, **Tablo 2.**) numaralandırılmalıdır. “Tablo”, “Şekil” sözcükleri ile bunlara ait numaralar koyu yazılmalı ve 11 punto olmalıdır. Şekil/Resim (JPG formatında) makale içinde yerleşmiş olmalıdır.
 8. Tablo adları Tabloların üstüne ve şekil adları da Şekillerin altına birer satır aralıkla ve bunların genişliğini aşmayacak şekilde 11 punto yazılmalıdır. Tabloya ait açıklama varsa tablonun altına 1 boşluk bırakılarak 9 punto ile yazılmalıdır. Tablo ve Şekiller metin içine yerleştirilirken metin ile aralarında net ayrımı sağlayacak kadar boşluk bırakılmalıdır.
 9. Paragraf başları 1 cm içeriden başlamalıdır.
 10. Uluslararası kısaltmalar kullanılabilir. Metin içinde mililitre için ml; dakika için dak. olarak belirtilen şekliyle yazılmalıdır.
 11. Makalelerin bölümleri Başlık, Öz, Anahtar kelimeler, Giriş, Gereç ve Yöntem, Sonuç ve Tartışma, Teşekkür ve Kaynaklar sırasına uygun olarak hazırlanmalıdır. Derleme makalelerinde Gereç ve Yöntem bölümü bulunmayabilir. Bu bölümler birbirlerinden 2 satır aralık ile ayrılmalıdır. Bu bölümleri ifade eden başlıklar 12 punto ile koyu olarak büyük harflerle ve sayfanın solundan başlanarak yazılmalıdır. Bölüm başlıkları ile metin arasında ayrıca aralık bırakılmamalıdır.
- **Başlık:** Türkçe ve İngilizce olarak büyük harf ve ilk başlık 14 punto, koyu ve ikinci başlık 12 punto, italik olarak yazılmalıdır. Başlık metine uygun, kısa, çalışmayı tanıttıcı ve açık ifadeli olmalıdır.
 - **Öz:** Türkçe ve İngilizce (Abstract) olarak makalelerin başında 200'er kelimeyi geçmeyecek şekilde 10 punto ile, *italik* olarak ve çerçeve içinde yazılmalıdır. Yabancı dilde yazılmış makalelerde mutlaka Türkçe özet bulunmalıdır. Ayrıca öz, kendi içinde amaç, gereç ve yöntem, sonuç ve tartışma olarak alt başlıklar halinde yazılmalıdır.
 - **Anahtar kelimeler:** En fazla 5 sözcükten oluşmalı ve özetlerin hemen altına ilgili dilde alfabetik ve italik olarak yazılmalıdır.
 - **Giriş:** Araştırmanın amacı ve konuyla ilgili çalışmaların yer aldığı bölüm olmalıdır.
 - **Gereç ve Yöntem:** Kullanılan gereç belirtilerek, uygulanan yöntem hakkında gerekli bilgiler açıkça ifade edilmelidir. Deneylerde hayvan kullanılması durumunda lokal etik komiteden veya ilgili düzenleyici makamlardan onay alınmalıdır ve bilgilendirilmiş onam belgelendirilmelidir.
 - **Sonuç ve Tartışma:** Bulguların verilerek değerlendirildiği bölümdür.

- **Teşekkür:** Varsa araştırmayı destekleyen kuruluşa ve katkısı olan kişilere kaynaklardan önce yer alan bu bölümde kısaca teşekkür edilebilir.
- **Kaynaklar:** Kaynak yazım stili Amerikan Psikoloji Derneği'ne (APA) göre dir. Metinde, geçiş sırasına göre köşeli parantez içinde, örneğin: [1,2,...] gibi numaralandırılmalı ve metin sonunda bu numaralara göre sıralanmalıdır. Kaynaklar aşağıdaki örneklere uygun olarak yazılmalıdır.

i. **Makale için:** Yazarın soyadı, adının baş harfleri, makalenin tam başlığı derginin adı, cilt no, varsa sayı no (parantez içinde), başlangıç ve bitiş sayfa no, yıl yazar isimlerinden sonra (parantez içinde) olarak yazılmalıdır. Birden fazla yazar varsa hepsi yazılmalıdır. Makalenin adı yazılırken ilk kelimenin ilk harfi büyük diğer kelimelerin ilk harfi küçük yazılmalıdır. Kaynaklarda verilen dergi adları kısaltma yapılmadan açık olarak yazılmalıdır.

Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A. (1989). Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochemistry and Pharmacology*, 38, 1709 – 1715.

ii. **Elektronik Makale için:**

Perneger, T. V. and Giner, F. (1998). Randomized trial of heroin maintenance programme for adults who fail in conventional drug treatments. *British Medical Journal*, 317. Retrieved August 12, 2005, from <http://www.bmj.com/cgi/content/full/317/7150/>

iii. **Web sitesi için:**

Clinical Pharmacology Web site. (2001). Retrieved June 16, 2004, from <http://cpip.gsm.com/>

iv. **Kitap için:** Yazarın soyadı, adının baş harfleri, kitabın adı, cilt no (varsa), kitabevi, yayımlandığı şehir, sayfa no, basıldığı yıl (parantez içinde) yazılmalıdır.

Franke, R. (1984). *Theoretical Drug Design Methods*, Elsevier, Amsterdam, p.130.

v. **Kitap Bölümü için:** Yazarın soyadı, adının baş harfleri, bölümün başlığı, editör/editörlerin soyadı, adının baş harfleri, (Ed./Eds.) ibaresi, kitabın adı, varsa cilt no, kitabevi, yayımlandığı şehir, sayfa no, basıldığı yıl (parantez içinde) yazılmalıdır.

Weinberg, E.D. (1979). Antifungal Agents. In: M.E. Wolff and S.E. Smith (Eds.), *Burger's Medicinal Chemistry*, (pp. 531-537). New York: John Wiley and Sons.

12. Bileşiklerin karakterizasyonu ayrı bir paragraf ile gösterilmeli ve yeni bileşiklerin saflıkları ve yapı aydınlatılmaları sağlanmalıdır.

Instruction for Authors

1. The Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University (J. Fac. Pharm. Ankara) is published three times (January-May-September) a year.
2. The Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University publishes articles in every field of Pharmaceutical Sciences. The manuscript to the journal should not be published previously as a whole or in part and not be submitted elsewhere. Manuscript should be written in Turkish or English. The experiments used have to be adhered to the Declaration of Helsinki for humans and European Community Guidelines for animals.
3. All manuscripts will be submitted to a review process by the editors and by qualified at least 2 outside reviewers.
4. Manuscripts are published in order of final acceptance after review and revision.
5. If a manuscript returned to the authors for revision is not received back to the editor within 3 months it will be treated as a new article. When the article is published, the by authors are considered to transfer all rights of the manuscript to the Publisher.
6. Manuscript will be controlled using plagiarism checker.
7. Manuscripts with the following characteristics are accepted:
 - a) **Research article:** Articles written in English or Turkish in scientific format presenting original research. Articles should be printed on A4 size papers not exceeding 20 pages (including tables and figures)
 - b) **Review:** An updated comprehensive review of scientific works on a particular subject. Articles written in English or Turkish should be printed on A4 size papers not exceeding 25 pages (including tables and figures).
 - c) **Rapid communication:** Rapid announcement of the results of a continuing research written in English or Turkish, no longer than 5, A4 size pages.

Submission of Manuscripts

Online submission: <https://dergipark.org.tr/en/pub/jfpanu>

Preparation of Manuscript

1. Manuscripts should be typed on A4 size papers marked in 21 x 29,7 cm area.
 2. All tables and figures should be inserted in the text, not exceeding text margins.
 3. Manuscripts should be typed with 1.5 line spacing with a margin of 2,5 cm on left-hand and right-hand sides, 3 cm on the top (5 line spacing on the first page) and bottom. Since articles will be loading online, authors are requested to submit their manuscripts as “Microsoft Word” file. The font of main text should be “Times New Roman” with 11 pt font size.
 4. Page numbers shouldn't be placed on the pages.
 5. Author names (first name with small letters, surname with capital letters, no qualification) should be written allowing 3 line space from the title of the article. Having more than one author, the names should be separated with comma and 1 free space. By using number as superscripts, the institution and mailing address of authors must be indicate on the next line.
 6. Title page of the manuscript should include title, authors' names and full mailing addresses. Corresponding author should be indicated by an asteriks (*). His/Her marking address, a fax, telephone numbers and e-mail address should indicate at the bottom of the title page.
 7. All tables and figures/images must be cited in the text consecutively. Every table must have a descriptive title at the top and should be numbered with Arabic numerals (**Table 1.**, **Table 2.**) Please submit tables as editable text and not as images. Figures (chemical formulas, graphics, photographs, chromatographs, spectra etc) should also be numbered with Arabic numerals (**Figure 1.**, **Figure 2.**) Captions should be typed with 11 pt font size. Figures/Images (JPG) should be embedded in the Manuscript file.
 8. An appropriate heading of tables and figures should be used for each and typed with 11 pt font size at the top of the table, at the bottom of the figure with one line space. If there is an explanation about the table, it should be written with 1 line space below and should be typed with 9 pt font size. Between text and figures/tables must be adequate space to distinguish each of them.
 9. In each paragraph, indentation must be done (1 cm space).
 10. International abbreviations should be used. In text ‘ml’ should be used for mililiter and ‘min’ should be used for minute to make harmonize for common abbreviation.
 11. Manuscripts should be organise as follows: Title, Abstract, Keywords, Introduction, Material and Method, Result and Discussion, Acknowledgement, References. Each section must be separated with 2 line spaces. The section titles must be written with bold capital letters at 12 pt font size. No line ‘ spaces between section headings and text.
- **Title:** It should be written in Turkish and English. Font size must be 14 pt as a bold for first title. In the second title, font size must be 12 pt as an italic. The title must be appropriate to the text.
 - **Abstract:** It should be written in Turkish and English no longer than 200 words, 10 pt, *Italic*. Abstract should be written in a border. If manuscript is written in a foreign language, must include Turkish abstract. In addition, the abstract should be written in subheadings as objective, material and method, result and discussion within itself.
 - **Keywords:** Up to 5 key words should be provided in alfabetic and *italic* at the end of the abstract.
 - **Introduction:** It should contain a clear statement of the aim and novelty of the study.
 - **Material and Method:** It should be described in sufficient detail to allow other works to dublicate the study. **If animals are used, authors must indicate that approvals of the relevant regulatory authorities or local ethical commitees were obtained and that appropriate regulatory or local ethical commitee approvals were obtained and that informed consent was documented.**

- **Result and Discussion:** The results must be clearly and concisely described with the help of appropriate illustrative material. The discussion should deal with the interpretation of the results.
- **Acknowledgement:** If necessary, this section should be given at the end of the text, before references.
- **References:** The style of references is that of the American Psychological Association (APA). They should be numbered with Arabic numerals consecutively in the order in which they first appear in the paper, for example: [1, 2,...]. Cited publications should be listed in numerical order at the end of the paper. If there is more than one author, all the names of the authors should be written. Examples are given below;

i. **Article:** Reference to a journal publication (journal names in full, not abbreviated)

Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A. (1989). Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication, *Biochemistry and Pharmacology*, 38, 1709 – 1715.

ii. **Electronic Article:**

Perneger, T. V. and Giner, F. (1998). Randomized trial of heroin maintenance programme for adults who fail in conventional drug treatments. *British Medical Journal*, 317. Retrieved August 12, 2005, from <http://www.bmj.com/cgi/content/full/317/7150/>

iii. **Web page:**

Clinical Pharmacology Web site. (2001). Retrieved June 16, 2004, from <http://cpip.gsm.com/>

iv. **Book:**

Franke, R. (1984). *Theoretical Drug Design Methods*, Elsevier, Amsterdam, p.130.

v. **Chapter in a book:**

Weinberg, E.D. (1979). Antifungal Agents. In: M.E. Wolff and S.E. Smith (Eds.), *Burger's Medicinal Chemistry*, (pp. 531-537). New York: John Wiley and Sons.

12. The characterization of compounds should be presented in a separate paragraph and for all new compounds, evidence to confirm both identity and purity have to be provided.

ANKARA ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ DERGİSİ

YAYIN SAHİBİNİN ADI : Prof. Dr. Asuman BOZKIR
SORUMLU YAZI İŞLERİ MÜDÜR ADI : Prof. Dr. İlkay YILDIZ
YAYIN İDARE MERKEZİ ADRESİ : Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Dekanlığı, 06560 Yenimahalle/Ankara
YAYIN İDARİ MERKEZİ ADRESİ TEL : 0 (312) 203 30 69
YAYIN TÜRÜ : Bilimsel Periyodik Elektronik Dergi, Yılda 3 Sayı

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

Özgün Makaleler / Original Articles

Sayfa / Page

- Ömer AKGÜL, Kadir BAKAN - **THE AEROBIC BACTERIA ISOLATED FROM USED COSMETIC PRODUCTS AND EVALUATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE** - KULLANILMIŞ KOZMETİK ÜRÜNLERDEN İZOLE EDİLEN AEROP BAKTERİLER VE ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ 156
- Ayşegül BÜKÜLMEZ, Ayşegül KÖROĞLU, Zeynep YEŞİLDAĞ, Gülmira ÖZEK - **İNFANTİL KOLİKLİ BİR BEBEKTE ELMA YAĞI NEDENLİ UYKUYA EĞİLİM** - APPLE OIL-INDUCED SLEEP TENDENCY IN AN INFANTILE COLIC BABY 169
- Gül BAYRAM, Abdoul NZEYIMANA, Semra UTKU, Mahmut ÜLGER, Gönül ASLAN, Erdoğan BERÇİN - **STUDY ON SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF SOME MICHAEL-TYPE ADDITION COMPOUNDS** - BAZI MICHAEL TİPİ KATIM ÜRÜNLERİNİN SENTEZ ÇALIŞMASI VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ 182
- Muammer ÇALIKUŞU, Gülsen GÜNEŞ, Gülbin ÖZÇELİKAY - **COVID-19 PANDEMİSİNİN TOPLUM ECZACILIĞI HİZMETLERİNE ETKİLERİ** - THE EFFECTS OF COVID-19 PANDEMIC ON COMMUNITY PHARMACY SERVICES 194
- Md Amjad BEG, Mustafa SEVİNDİK, Shahid Tanweer HAIDER, Preeti SONI, Priya BHATIA, Shahzul HASAN, Richa YADAV, Fareeda ATHAR - **MOLECULAR BASIS AND INTEGRATIVE ANALYSIS OF Rv1463 AS PROBABLE CONSERVED ATP-BINDING PROTEIN BY COMPUTATIONAL APPROACH** - RV1463 OLASI KORUNMUŞ ATP BAĞLAYICI PROTEİNİN HESAPLAMALI YAKLAŞIMLA MOLEKÜLER TEMEL BÜTÜNLEŞTİRİCİ ANALİZİ 212
- Begum EVRANOS AKSÖZ, Fatma KAYNAK ONURDAĞ, Erkan AKSÖZ, Selda ÖZGEN ÖZGACAR - **BAZI 4,5-DİHİDRO-1H-PİRAZOL VE ŞALKON TÜREVLERİNİN ANTİMİKROBİYAL VE ANTİTÜBERKÜLER ETKİLERİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR** - INVESTIGATIONS ON ANTIMICROBIAL AND ANTITUBERCULAR ACTIVITY OF SOME 4,5-DIHYDRO-1H-PYRAZOLE AND CHALCONE DERIVATIVES 227
- Ayşe Arzu ŞAKUL, Mehmet Evren OKUR - **BETA-SİTOSTEROL AND ITS ANTİNOCICEPTIVE MECHANISM ACTION** - BETA-SİTOSTEROL VE ANTİNOSİSEPTİF ETKİ MEKANİZMASI 238
- Shripad BAIRAGI, Prashant GHULE, Ritu GILHOTRA - **IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF β-SİTOSTEROL IN LEAF OF CALOTROPIS GIGANTEA AND CALOTROPIS PROCERA BY HPTLC** - HPTLC İLE CALOTROPIS GIGANTEA VE CALOTROPIS PROCERA YAPRAĞINDAKİ β-SİTOSTEROLÜN TANIMLANMASI VE MİKTAR TAYİNİ 253
- Mehmet KOCA, Emrah ÖZAKAR, Rukiye SEVİNÇ ÖZAKAR - **TRİİYODOANİLİNİN SENTEZLENMESİ, NANOSÜSPANSİYONLARININ HAZIRLANMASI, İN VİTRO KARAKTERİZASYONU VE RADYOKONTRAST ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ** - SYNTHESIS OF TRIODOANILINE, PREPARATION OF NANOSUSPENSIONS, IN VITRO CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF RADIOCONTRAST PROPERTIES 264
- Malayappan Maria JULIE, Thirutanasambantam PRABU, Fazilath Basha ASIF, Sambanthan MUTHU - **IN SILICO DRUG EVALUATION AND DRUG RESEARCH OF BIOACTIVE MOLECULE METHYL 4-BROMO-2-FLUOROBENZOATE**- BİYOAKTİF MOLEKÜL METİL 4-BROMO-2-FLOROBENZOAT'IN İN SİLİKO İLAÇ DEĞERLENDİRMESİ VE ARAŞTIRMASI 284

Süleyman KAYAN, Nurten ALTANLAR - HASTANELERDE SIKLIKLA KULLANILAN BAZI DEZENFEKTAN VE ANTİSEPTİKLERİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI - INVESTIGATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF SOME DISINFECTANTS AND ANTISEPTICS WHICH ARE FREQUENTLY USED IN HOSPITALS	297
Gülnur EKŞİ, Gülderen YILMAZ, Mehmet BONA, Ayşe Mine GENÇLER ÖZKAN - CUPANIOSCORDUM SEKSİYONUNA AİT ÜÇ ALLIUM L. (AMARYLLIDACEAE) TÜRÜNÜN YAPRAK VE SKAPUS ANATOMİSİ - LEAF AND SCAPE ANATOMY OF THREE ALLIUM L. (AMARYLLIDACEAE) SPECIES FROM SECT. CUPANIOSCORDUM	309
Anastasiia DONCHENKO, Katerina MIEDVIEDIEVA, Oleksii VOSKOBOINIK, Svitlana VASYUK, Serhii KOVALENKO - STUDY OF THE STRUCTURE OF PRODUCTS OF INTERACTION BETWEEN SOME NAPHTHOQUINONE DERIVATIVES AND PHARMACEUTICAL SUBSTANCES - BAZI NAFTOKİNON TÜREVELERİ İLE İLAÇ MADDELERİ ARASINDAKİ ETKİLEŞİM ÜRÜNLERİNİN YAPISININ İNCELENMESİ	321
Aayushi CHANDERİYA, Ratnesh DAS - FABRICATION OF ELECTROCHEMICAL NANOSENSOR BASED ON CuO AND GRAPHITE POWDER AND ITS APPLICATION FOR TRACE ANALYSIS OF OP (ORGANOPHOSPHORUS) PESTICIDES IN REAL SAMPLES - CuO VE GRAFİT TOZUNA DAYALI ELEKTROKİMYASAL NANOSENSÖR İMALATI VE GERÇEK NUMUNELERDE OP (ORGANOFOSFOR) PESTİSİTLERİNİN ESER MADDE ANALİZİ İÇİN UYGULAMASI	332
<i>Derlemeler / Reviews</i>	
Ceren ÖZTÜRK, Funda ATİLA - MANTARLARIN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ İLE İLGİLİ İN VİTRO, İN VİVO VE KLİNİK DEĞERLENDİRMELER - IN VITRO, IN VIVO AND CLINICAL ASSESSMENT ABOUT THE MEDICINAL CHARACTERISTICS OF MUSHROOMS	344
Cenk YILDIZ, Burcu DEVRİM - PULMONER ARTERİYEL HİPERTANSİYON TEDAVİSİNDE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR - CURRENT APPROACHES IN PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION TREATMENT	379
İrem Nur ÇELİK, Firdevs Kübra ARSLAN, Ramazan TUNÇ, İlkay YILDIZ - İLAÇ KEŞFİ VE GELİŞTİRİLMESİNDE YAPAY ZEKÂ - ARTIFICIAL INTELLIGENCE ON DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT	400
Mahmut Ozan TOKSOY, Fahriye Figen TIRNAKSIZ - KATI LİPİT NANOPARTİKÜLLER VE BEYNE ÖZGÜ İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM OLARAK UYGULAMALARI - SOLID LIPID NANOPARTICLES AND APPLICATIONS AS BRAIN SPECIFIC DRUG DELIVERY SYSTEMS	428
Nuran COŞKUN, Özge CEMİLOĞLU ÜLKER - COVID-19 TEDAVİSİNDE İLAÇ-İLAÇ ETKİLEŞİMLERİNİN FARMAKOKİNETİK AÇIDAN DEĞERLENDİRİLMESİ - PHARMACOKINETIC EVALUATION OF DRUG-DRUG INTERACTIONS IN THE TREATMENT OF COVID-19	443